

Sara Cristina Magalhães Monteiro

# **Automatização do processo de extracção em fase sólida para a determinação de compostos fenólicos em alimentos**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre  
em Controlo de Qualidade

**Orientador:** Doutora Marcela Alves Segundo

**Co-orientador:** Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima

Setembro de 2010

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

## **Agradecimentos**

À instituição Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por me ter admitido como aluna do Mestrado em Controlo de Qualidade.

Ao Prof. Doutor José L. F. da Costa Lima, pela supervisão deste trabalho, por me ter dado a conhecer o tema do mesmo e pelo apoio pedagógico e científico ao longo do Mestrado.

À Doutora Marcela A. Segundo, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela amizade, orientação, conhecimento científico, disponibilidade e empenho fundamentais na execução e escrita deste trabalho e pela paciência e motivação constantes.

Ao Doutor Luís M. Magalhães, pela disponibilidade, conhecimento científico e apoio essenciais na concretização experimental deste trabalho.

Ao Doutor Hugo M. Oliveira, pela disponibilidade e apoio na concretização experimental no início deste trabalho.

A todos as pessoas que integram o laboratório de Química-Física, pelo companheirismo demonstrado e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

Aos meus colegas de Mestrado, pela amizade e convivência ao longo do mesmo.

Aos meus pais, pelo carinho, dedicação e apoio incondicionais, pelo contributo único e essencial à minha formação e pelo incentivo ao conhecimento e valorização pessoal.

Ao Nuno Cascais, pelo amor, paciência e apoio incondicionais e pela motivação na minha realização pessoal.

A todos que, de alguma forma, colaboraram na realização deste trabalho.

## **Resumo**

O principal objectivo do trabalho apresentado na presente dissertação foi a implementação de um sistema “lab-on-valve” (LOV) associado ao conceito de “bead injection” aplicado à extracção em fase sólida de compostos fenólicos presentes em amostras alimentares, seguida pela quantificação através do método de Folin-Ciocalteu.

Foi desenvolvido um ciclo analítico automático contendo as principais etapas do processo de extracção em fase sólida, incluindo neste caso também a formação da coluna de adsorvente OASIS<sup>TM</sup> HLB num dos canais do dispositivo LOV. Foi efectuada a avaliação da retenção dos compostos na coluna utilizando o ácido gálico como composto modelo. Neste caso foi avaliada a influência da composição da matriz da amostra e da solução transportadora usada na remoção da matriz. Também foi avaliada a eficiência da eluição recorrendo a distintos eluentes. A utilização de padrões acidificados com HCl 10 mM, o uso de água com transportador e a utilização da solução eluente composta por metanol 50% (v/v) + hidróxido de sódio 10 mM foram as condições escolhidas para posterior aplicação às amostras.

O procedimento automático desenvolvido foi aplicado a outros compostos fenólicos (ácido cafeico, galhato de octilo, quercetina e ácido tânico), a um composto não-fenólico (ácido ascórbico), reactivo e quantificável pelo método de Folin-Ciocalteu, e a amostras de vinho tinto e sumo de laranja. Os resultados obtidos para os compostos testados evidenciaram a retenção selectiva dos compostos fenólicos e a não-retenção do ácido ascórbico, tendo sido possível estimar a contribuição dos compostos fenólicos na capacidade redutora das amostras através do método de Folin-Ciocalteu.

**Palavras-chave:** compostos fenólicos, extracção em fase sólida, sistema automático lab-on-valve, método de Folin-Ciocalteu

**Abstract**

The main objective of the work presented in this dissertation was the development of a lab-on valve (LOV) system associating the bead injection concept for application to solid phase extraction of phenolic compounds in food samples, followed by their quantification using the Folin-Ciocalteu method.

An analytical cycle comprising the main steps present on solid phase extraction protocols was implemented, including also the on-line formation of OASIS<sup>TM</sup> HLB sorbent column inside one of the channels of LOV device. The retention of phenolic compounds on this sorbent was evaluated using gallic acid as model analyte under different sample matrix and carrier solution compositions. Elution efficiency was also assessed for different eluents. Application to samples was attained using standard solutions prepared in HCl 10 mM, water as carrier and methanol 50% (v/v) + sodium hydroxide 10 mM as eluent.

The automatic protocol was applied to several phenolic compounds (caffeic acid, octylgallate, quercetin and tannic acid), to a non-phenolic compound (ascorbic acid), which reacts with and can be quantified by Folin-Ciocalteu method, and also to red wine and orange juice samples. Results obtained showed that phenolic compounds were retained selectively and ascorbic acid was not retained, which allowed the estimation of phenolics contribution to the Folin-Ciocalteu reducing index for antioxidant assessment.

**Keywords:** phenolic compounds, solid phase extraction, automatic system lab-on-valve, Folin-Ciocalteu method

## Índice

Abreviaturas e símbolos .....	x
1. Introdução .....	2
1.1. Extracção em fase sólida .....	2
1.2. Automatização da extracção em fase sólida recorrendo a sistemas “lab-on-valve” associados ao conceito “bead injection” .....	4
1.2.1. Sistemas “lab-on-valve” .....	5
1.2.2. Conceito “bead injection” .....	6
1.3. Determinação da capacidade antioxidante .....	9
1.3.1. Métodos baseados na capacidade antioxidante total .....	9
1.3.2. Capacidade antioxidante baseada no método de Folin-Ciocalteu .....	11
1.4. Enquadramento e objectivos .....	12
2. Material e métodos .....	14
2.1. Reagentes e soluções .....	14
2.1.1. Soluções usadas na preparação das amostras/padrões .....	14
2.1.2. Preparação das soluções padrão .....	15
2.1.3. Preparação das amostras .....	16
2.1.4. Soluções usadas no sistema LOV-BI .....	16
2.1.5. Soluções usadas no método Folin-Ciocalteu .....	16
2.2. Instrumentação .....	17
2.3. Procedimento automático de extracção em fase sólida .....	19
2.3.1. Formação da coluna extractora e condicionamento do adsorvente .....	20
2.3.2. Carregamento da amostra e remoção da matriz .....	21

2.3.3. Eluição dos compostos retidos no adsorvente .....	22
2.3.4. Descarte das partículas de Oasis <sup>TM</sup> HLB .....	23
2.4. Procedimento para avaliação da capacidade redutora pelo método de Folin-Ciocalteu .....	24
3. Resultados e discussão.....	26
3.1. Implementação do protocolo de extracção em fase sólida no sistema BI-LOV ....	26
3.2. Estudo das condições do processo de extracção.....	28
3.2.1. Estudo do perfil de não retenção (“breakthrough”).....	28
3.2.2. Estudo da composição do eluente .....	40
3.3. Aplicação do procedimento de extracção automática .....	48
3.3.1. Aplicação a compostos puros .....	48
3.3.2. Aplicação a amostras.....	55
4. Conclusões .....	61
5. Referências Bibliográficas .....	64

## Índice de figuras

Figura 1.1. Dispositivo “Lab-on-valve” .....	6
Figura 1.2. Representação esquemática do sistema hifenizado MSFIA-HPLC .....	8
Figura 2.1. Montagem laboratorial do sistema de fluxo.....	17
Figura 2.2. Módulos LOV e multi-seringa.....	18
Figura 2.3. Leitor de micro-placas e computador .....	19
Figura 2.4. Vista pormenorizada da válvula LOV e respectivas portas/canais .....	20
Figura 3.1. Representação da percentagem de não-retenção (“breakthrough”) do ácido gálico em função da alimentação de alíquotas consecutivas de 1000 $\mu\text{L}$ contendo 20 $\text{mg L}^{-1}$ de ácido gálico .....	30
Figura 3.2. Representação da percentagem de não-retenção (“breakthrough”) do ácido gálico em função da alimentação de alíquotas consecutivas de 1000 $\mu\text{L}$ contendo 5 $\text{mg L}^{-1}$ de ácido gálico .....	34



## Índice de tabelas

Tabela 1.1. Principais características dos métodos específicos para radicais estáveis e não biológicos e para avaliação da capacidade de redução total .....	11
Tabela 2.1. Protocolo experimental do carregamento das partículas adsorventes e condicionamento da coluna.....	21
Tabela 2.2. Protocolo experimental do carregamento da amostra e remoção da matriz .....	22
Tabela 2.3. Protocolo experimental da eluição dos compostos retidos no adsorvente...	23
Tabela 2.4. Protocolo experimental correspondente ao descarte das partículas de Oasis™ HLB e limpeza do canal da coluna .....	23
Tabela 3.1. Resumo das variáveis estudadas na experiência para a determinação do perfil de pré-eluição (“breakthrough”) de uma solução contendo 20 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálgico.....	29
Tabela 3.2. Valores de concentração de ácido gálgico (mg L <sup>-1</sup> ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios A a E referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo 20 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálgico.....	29
Tabela 3.3. Valores calculados para a massa de ácido gálgico (µg) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de 1000 µL de uma solução de ácido gálgico 20 mg L <sup>-1</sup> .....	30
Tabela 3.4. Valores calculados para a massa de ácido gálgico (µg) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálgico (µg) eluída com uma alíquota de 300 µL de metanol, resultantes da alimentação de uma solução de 20 mg L <sup>-1</sup> .....	31
Tabela 3.5. Valores de concentração de ácido gálgico (mg L <sup>-1</sup> ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios A-E referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo 5 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálgico.....	33

Tabela 3.6. Valores calculados para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de 1000 $\mu\text{L}$ de uma solução de ácido gálgico 5 $\text{mg L}^{-1}$ .....	34
Tabela 3.7. Valores calculados para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com uma alíquota de 300 $\mu\text{L}$ de metanol, resultantes da alimentação de uma solução de 5 $\text{mg L}^{-1}$ .....	35
Tabela 3.8. Valores de concentração de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B e E referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo 5 $\text{mg L}^{-1}$ de ácido gálgico.....	36
Tabela 3.9. Valores calculados para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de 1000 $\mu\text{L}$ de uma solução de ácido gálgico 5 $\text{mg L}^{-1}$ para os ensaios B e E .....	36
Tabela 3.10. Valores calculados para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com uma alíquota de 300 $\mu\text{L}$ de metanol, resultantes da alimentação de uma solução de 5 $\text{mg L}^{-1}$ nos ensaios B e E .....	37
Tabela 3.11. Valores de concentração de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B e E, realizados em triplicado, referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo 5 $\text{mg L}^{-1}$ de ácido gálgico.....	38
Tabela 3.12. Valores calculados para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de 1000 $\mu\text{L}$ de uma solução de ácido gálgico 5 $\text{mg L}^{-1}$ para os ensaios B e E, realizados em triplicado.....	39
Tabela 3.13. Valores calculados para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com uma alíquota de 300 $\mu\text{L}$ de metanol.....	39
Tabela 3.14. Valores de concentração de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B, G e H, realizados em duplicado, referentes ao	

estudo da composição do eluente aplicado a uma solução padrão contendo 5 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálgico .....	42
Tabela 3.15. Valores calculados para a massa de ácido gálgico (µg) eluída com duas alíquota de 300 µL de metanol (ensaio B), metanol 50% (v/v) + NH <sub>4</sub> OH 5% (v/v) (ensaio G) e metanol 50% (v/v) (ensaio H) .....	43
Tabela 3.16. Valores de concentração de ácido gálgico (mg L <sup>-1</sup> ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B, G e H, realizados em duplicado, referentes ao estudo da composição do eluente aplicado a uma solução padrão contendo 5 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálgico. A um dos ensaios ("acid.") foi adicionado HCl imediatamente após a eluição da coluna extractora.....	44
Tabela 3.17. Valores calculados para a massa de ácido gálgico (µg) eluída com a primeira alíquota de 300 µL de metanol (ensaio B), metanol 50% (v/v) + NH <sub>4</sub> OH 5%(v/v) (ensaio G) e metanol 50% (v/v) (ensaio H), incluindo ou não ácido logo a seguir à eluição.....	45
Tabela 3.18. Valores de concentração de ácido gálgico (mg L <sup>-1</sup> ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B, G e H, realizados em duplicado, referentes ao estudo da composição do eluente aplicado a uma solução padrão contendo 5 mg L <sup>-1</sup> de ácido gálgico. A um dos ensaios ("acid.") foi adicionado HCl imediatamente após a eluição da coluna extractora (repetição).....	47
Tabela 3.19. Valores calculados para a massa de ácido gálgico (µg) eluída com a primeira alíquota de 300 µL de metanol (ensaio B), metanol 50% (v/v) + NH <sub>4</sub> OH 5%(v/v) (ensaio G) e metanol 50% (v/v) (ensaio H), incluindo ou não ácido logo a seguir à eluição (repetição).....	48
Tabela 3.20. Valores de concentração de ácido gálgico (mg L <sup>-1</sup> ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas para o processamento das soluções padrão A-D, realizados em duplicado.....	49
Tabela 3.21. Valores calculados para a massa de ácido gálgico (µg) eluída com a primeira alíquota de 300 µL de eluente para soluções padrão com diferentes concentrações de ácido gálgico .....	50

Tabela 3.22. Valores de concentração de ácido cafeico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto .....	51
Tabela 3.23. Valores de concentração de galhato de octilo ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto .....	51
Tabela 3.24. Valores de concentração de quercetina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto .....	51
Tabela 3.25. Valores de concentração de ácido tânico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto .....	52
Tabela 3.26. Valores de concentração de ácido ascórbico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto .....	52
Tabela 3.27. valores calculados para a massa dos compostos testados ( $\mu\text{g}$ ) nas várias etapas do procedimento de extracção em fase sólida .....	54
Tabela 3.28. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra A.....	56
Tabela 3.29. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra B.....	56
Tabela 3.30. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra C.....	57
Tabela 3.31. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra D.....	57

Tabela 3.32. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra E..... 57

Tabela 3.33. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálgico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra F..... 58

Tabela 3.34. Valores calculados para a massa equivalente em ácido gálgico ( $\mu\text{g}$ ) para as amostras testadas nas várias etapas do procedimento de extracção em fase sólida . 59

## **Abreviaturas e símbolos**

ABTS 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

BI "bead injection"

DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DPR desvio-padrão relativo

$E_{1/2}$  potencial de oxidação

EC concentração eficiente

Etc. "et cetera"

FC Folin-Ciocalteu

FIA análise por injeção em fluxo (do inglês "flow injection analysis")

FRAP poder férrico de redução antioxidante (do inglês "ferric reducing antioxidant power")

HPLC cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês "high-performance liquid chromatography")

$K_D$  coeficiente de distribuição

$I_a$  intensidade da corrente anódica

LD limite de detecção

LOV "lab-on-valve"

MSFIA análise por injeção em fluxo baseada em multi-seringa (do inglês "multisyringe flow injection analysis")

n.a. não aplicável

n.d. não detectável

PTFE politetrafluoroetileno

R coeficiente de correlação

RSE eficiência de captação do radical (do inglês "radical scavenging efficiency")

RNS espécies reactivas de azoto (do inglês “reactive nitrogen species”)

ROS espécies reactivas de oxigénio (do inglês “reactive oxygen species”)

SIA sistema de análise por injeção sequencial (do inglês “sequential injection analysis”)

SPE extracção em fase sólida (do inglês “solid-phase extraction”)

TEAC capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox. (do inglês “Trolox equivalent antioxidant capacity”)





## 1. Introdução

Quando é colocado um problema na área da química analítica e a solução envolve a análise de uma ou mais amostras, através de um ou vários métodos e recorrendo a determinados equipamentos, estas amostras têm, antes de mais, uma composição muitas vezes desconhecida. Por outro lado, pode-se dizer que qualquer amostra é complexa, constituída por diversos compostos químicos e o seu aspecto físico poderá ser variável. Os analitos existentes na amostra e que são objecto de estudo poderão também estar em quantidades variáveis e desconhecidas. É de todo o interesse encontrar uma forma de os separar de possíveis compostos interferentes e/ou de os pré-concentrar, para que o sinal analítico obtido através do método de determinação corresponda claramente ao(s) analito(s) em estudo e seja, tanto quanto possível, detectável e quantificável.

Neste contexto, a preparação prévia da amostra é deveras importante e deverá ter em conta os seguintes aspectos: natureza das amostras (quer em termos de complexidade, quer em termos do estado físico), analitos de interesse e a sua concentração prevista na amostra, o método de análise e respectivo limite de detecção, além da precisão e da exactidão pretendidas [1]. Existem diversos métodos de tratamento de amostras, tais como lavagem, secagem, moagem, filtração, cromatografia preparativa, extracção líquido-líquido, diluição, solubilização, diálise, extracção em fase sólida, entre outros. O tratamento seleccionado depende do estado inicial da amostra, do tipo de amostra, dos analitos em estudo, do método de determinação e deverá ser executado com rigor, para que não ocorram erros devido a perdas ou contaminações.

Tendo em conta o assunto desenvolvido nesta dissertação, a extracção em fase sólida como tratamento para preparação da amostra previamente à etapa de determinação, e também a automatização deste tratamento através da associação do sistema “lab-on-valve” ao conceito “bead injection” (LOV-BI) serão particularizadas nas secções 1.1 e 1.2. Na secção 1.3 serão discutidos os procedimentos para determinar a capacidade antioxidante, também objecto de estudo deste trabalho, e na secção 1.4 serão clarificados os objectivos propostos neste trabalho.

### 1.1. Extracção em fase sólida

A extracção em fase sólida com aplicação analítica surgiu apenas na década de 70 do século passado, apesar da sua existência remontar à época medieval, onde já se

utilizaria este conceito para extrair fragrâncias voláteis das pétalas de rosa, incorporando-as em parafina [2]. Esta técnica de preparação consiste num processo que envolve a passagem de uma solução que contém o composto de interesse através de uma coluna empacotada com uma fase sólida. O composto de interesse vai distribuir-se entre a amostra no estado líquido e a fase sólida (sendo adsorvido na sua superfície) atingindo-se, assim, um equilíbrio. Este equilíbrio pode ser traduzido por um coeficiente de distribuição ( $K_D$ ), que corresponde à fracção que ficou adsorvida na fase sólida sobre a fracção do analito que permaneceu na solução, ou seja, será o quociente entre a actividade do analito adsorvido e a actividade do analito presente na solução, ou ainda, a concentração do analito adsorvido sobre a concentração do analito na solução [2]. À etapa de total adsorção na fase sólida, dá-se o nome de retenção. Após a concretização desta etapa, segue-se a eluição, que consiste na dessorção do analito, ou seja, a sua remoção da fase sólida e posterior recolha para a análise. Para tal, recorre-se a uma solução denominada solvente de eluição ou eluente, à qual o analito tem mais afinidade química e que arrastará o mesmo para o recipiente de recolha colocado à saída da coluna. Este eluente pode ser um reagente orgânico ou aquoso, mesmo quando a amostra é aquosa, pois estes não entram em contacto directo durante a extracção em fase sólida. No entanto, se a matriz e possíveis interferentes tiverem ficado retidos na fase sólida, estes poderão também ser eluídos e, desta forma, influenciarem significativamente os resultados analíticos. Realiza-se, neste caso, uma etapa intermédia de limpeza, entre a retenção e a eluição, utilizando para o efeito uma solução de lavagem apropriada, que irá arrastar os compostos interferentes e eliminar a matriz. Assim sendo, os objectivos desta técnica preparativa são: concentração do(s) analito(s), remoção dos compostos indesejáveis da amostra (etapa de limpeza, ou do inglês “clean-up”) e remoção da matriz da amostra [2].

É importante referir que a extracção em fase sólida raramente é utilizada sem recorrer a outros tratamentos, nomeadamente a diluição ou ajuste de pH da amostra. No entanto, esta técnica permite reduzir substancialmente outros tratamentos que seriam necessários para isolar os compostos-alvo e que são mais morosos, tal como a diálise ou a extracção líquido-líquido.

Existem diversos adsorventes que se podem utilizar, dependendo da aplicação pretendida, tais como: sílica, alumina (utilizados principalmente antes da cromatografia líquida de alta eficiência), grafite e adsorventes poliméricos [2]. Estes últimos são materiais totalmente orgânicos, obtidos a partir da polimerização de um composto, como, por exemplo, o estireno. No final, obtém-se um adsorvente esférico que é adequado para

a extracção em fase sólida. A principal vantagem destes materiais poliméricos consiste na sua capacidade de suportar condições extremas de pH, o que não é possível com adsorventes de sílica. Vários materiais poliméricos funcionalizados que possuem propriedades apolares têm sido sintetizados nas duas últimas décadas, como é o caso da Oasis<sup>TM</sup> (Waters Inc. Milford, Massachusetts). Estes oferecem uma forte retenção para compostos de elevada polaridade, tais como os fenólicos, que são objecto de estudo deste trabalho.

Actualmente existe uma grande variedade de adsorventes comercialmente disponíveis, empacotados em cartuchos, colunas ou mesmo em microplacas com 96 poços. As quantidades de adsorvente existente em cada um destes dispositivos são distintas e adequadas a determinados volumes de amostra. A automatização do processo de extracção em fase sólida é geralmente baseada na utilização de estações robóticas, que requerem um investimento financeiro elevado em termos de aquisição e manutenção, ou recorre ao acoplamento em linha de colunas ao equipamento de cromatografia líquida [3]. Neste último caso, a eluição é efectuada com a fase móvel e o adsorvente não é renovado entre amostras, o que suscita problemas relacionados com a possível contaminação entre amostras consecutivas [4].

## 1.2. Automatização da extracção em fase sólida recorrendo a sistemas “lab-on-valve” associados ao conceito “bead injection”

De todas as etapas da sequência analítica, a etapa de tratamento da amostra é, sem dúvida, a que mais interesse suscita no controlo de erros analíticos pelo elevado registo de ocorrência dos mesmos. Para além disso, é a etapa mais morosa e que consome mais recursos (reagentes, horas de trabalho do operador). Por estas razões, é desejável que durante esta etapa ocorra uma menor intervenção do operador, um menor número de operações possível e uma maior celeridade em todo o processo de modo a evitar a perda de analito e degradação da amostra. Neste contexto, as técnicas de fluxo baseadas na análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “flow injection analysis”) [5] possibilitaram a automatização de algumas, senão todas, etapas do tratamento da amostra [6,7].

A partir da introdução dos computadores nos laboratórios durante a década de 90, a técnica FIA evoluiu para a análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “sequential injection analysis”) [8], baseada no conceito de um canal único, central, a partir de onde as soluções são distribuídas para canais periféricos através da inversão do fluxo do

transportador. A miniaturização da técnica SIA originou os sistemas LOV, particularizados na secção seguinte.

### 1.2.1. Sistemas “lab-on-valve”

No sentido de automatizar etapas do procedimento analítico e de manipular soluções numa escala microfluídica, foram propostos os sistemas LOV (do inglês “lab-on-valve”) em 2000 [9]. Estes sistemas permitem a manipulação precisa de volumes da ordem dos microlitros (1 – 20  $\mu\text{L}$ ) e o acoplamento do detector directamente à peça através da utilização de fibras ópticas [10] ou eléctrodos [11]. Estes sistemas baseiam-se na utilização de uma peça monolítica com microcanais gravados na mesma, ajustada ao rotor de uma válvula de selecção comercial de um sistema SIA, onde é possível programar o sentido do fluxo, e a quantidade e o caudal de manipulação das soluções (Figura 1.1). Amostra e reagente(s) são aspirados através da válvula de selecção para um reaktor de armazenamento (do inglês “holding coil”), onde ocorre a mistura e reacção. Após inversão do fluxo, a mistura é enviada para o detector onde será analisada ou para outro dispositivo colocado numa das portas periféricas. O uso de uma válvula multi-posicional possibilita o acesso a diversas portas periféricas, às quais poderão estar ligados os reservatórios com reagentes e amostra, o detector, ou outros dispositivos. Esta proximidade entre a zona de mistura entre reagente e amostra e o detector facilita a aplicação de volumes reduzidos, minimizando a dispersão e a aplicação em micro-escala de reacções já usadas noutros sistemas em fluxo, sem perda de sensibilidade. Uma característica relevante destes sistemas é a redução do consumo de reagentes e de resíduos gerado que possibilita uma diminuição dos custos operacionais. Outra característica relevante dos sistemas “lab-on-valve” é a de que podem ser associados ao conceito de “bead injection”, particularizado na secção seguinte.

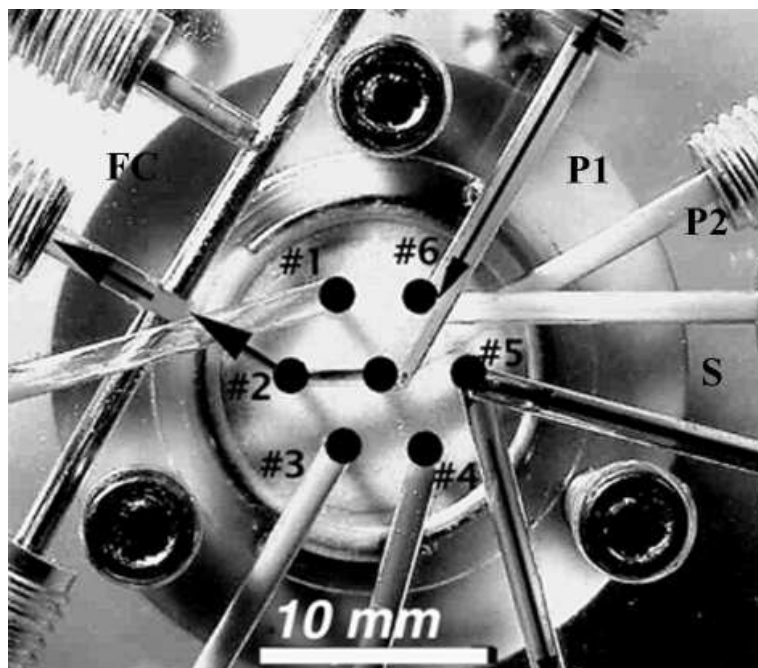


Figura 1.1. Dispositivo “Lab-on-valve” posicionado numa válvula de selecção de 6 portas [9]. Copyright The Royal Society of Chemistry 2000

### 1.2.2. Conceito “bead injection”

Conforme mencionado anteriormente, os sistemas “lab-on-valve” transpuseram a manipulação de soluções para uma escala micro-fluídica e, associado a estes sistemas, está frequentemente o conceito “bead injection”. Apresentado em 1999, através da utilização de uma célula de fluxo dedicada (do inglês “jet ring cell”), consiste na manipulação de suspensões de partículas (10 – 200  $\mu\text{m}$ ) no interior dos sistemas de fluxo, partículas estas que podem servir como veículos de reagentes ou de grupos funcionais [12]. Um dos aspectos mais relevantes está relacionado com a utilização renovável desta fase sólida, dado que é possível introduzir as partículas suspensas numa das portas laterais do sistema LOV, formando uma micro-coluna de fase sólida “in situ” por restrição física da saída do canal através de um filtro ou tubo estreito de material inerte. Esta coluna pode ser usada para extracção/pré-concentração de compostos presentes na amostra [13], como reactores contendo células vivas [14] ou mesmo como fase estacionária para cromatografia de imuno-afinidade [15].

A extracção em fase sólida é sem dúvida uma técnica de tratamento de amostra frequentemente automatizada recorrendo a técnicas de fluxo, dada a sua elevada capacidade de separação e pré-concentração e consumo mínimo de solventes orgânicos. No entanto, as colunas empacotadas reutilizáveis utilizadas convencionalmente

apresentam diversos problemas já mencionados, tais como a contaminação entre amostras consecutivas (efeito “carry-over”), contracção ou expansão do leito de adsorvente, perda dos grupos responsáveis pela retenção do analito e, finalmente, adsorção de espécies interferentes. Estes inconvenientes podem ser eliminados recorrendo ao uso de colunas renováveis, através do conceito de “bead injection”, onde a fase sólida pode ser renovada em cada ciclo analítico [16].

De modo a garantir a reprodutibilidade das partículas sólidas no sistema automático, é imperativo assegurar a homogeneidade do tamanho e da utilização de partículas com forma esférica, sendo por isso difícil a utilização de colunas empacotadas com fase reversa C<sub>18</sub> ou de sílica gel, dada a irregularidade da forma das partículas e na distribuição de tamanhos. No entanto, o uso de agarose ou de alguns polímeros comerciais, como por exemplo o Oasis<sup>TM</sup>, é exequível pela sua forma e tamanho uniforme. Recentemente, foram propostas novas estratégias para a manipulação da fase sólida no interior dos micro-canais do dispositivo LOV que permitem o uso de qualquer tipo de adsorvente, independentemente da sua forma ou regularidade do tamanho da partícula [17]. Neste caso, a aplicação de um passo de ressuspensão antes da recolha da fase sólida para o canal central revelou-se fulcral para a obtenção de um empacotamento posterior repetível num dos canais laterais do dispositivo LOV.

Os sistemas de fluxo baseados em LOV-BI têm demonstrado um potencial significativo na análise ambiental, nomeadamente na remoção da matriz em lixiviados [18,19] e enriquecimento do analito alvo [19,20], através de micro-colunas empacotadas numa das portas da válvula multiposicional. A aplicação à área alimentar tem sido mais limitada, existindo vários exemplos da aplicação dos sistemas LOV à área alimentar [21-23], mas apenas uma aplicação recente conjugando LOV e BI [24].

Em 2010 foi proposto um método hifenizado, englobando um sistema LOV-BI e cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de riboflavina em alimentos, nomeadamente amostras de leite infantil, fígado de porco e bebidas energéticas [24]. Foi implementada a extracção em fase sólida como tratamento prévio da amostra recorrendo a um polímero de impressão molecular comercial, selectivo à riboflavina. O procedimento automático foi baseado no conceito de “bead injection”, executado num dispositivo “lab-on-valve” (LOV) e utilizando como unidade de propulsão uma bureta multi-seringa para manuseamento das soluções e da suspensão de fase sólida, conforme representado na Figura 1.2. O protocolo para preparação da amostra consistiu na formação de uma micro-coluna num dos canais laterais do dispositivo LOV, por onde a amostra foi percolada, ocorrendo a retenção da riboflavina. Seguiu-se a eluição deste composto com 50% (v/v)

metanol/água + 1% (v/v) ácido acético, sendo o eluato diluído em linha com água (proporção 1:2) antes da introdução na alça de injeção da válvula do cromatógrafo.

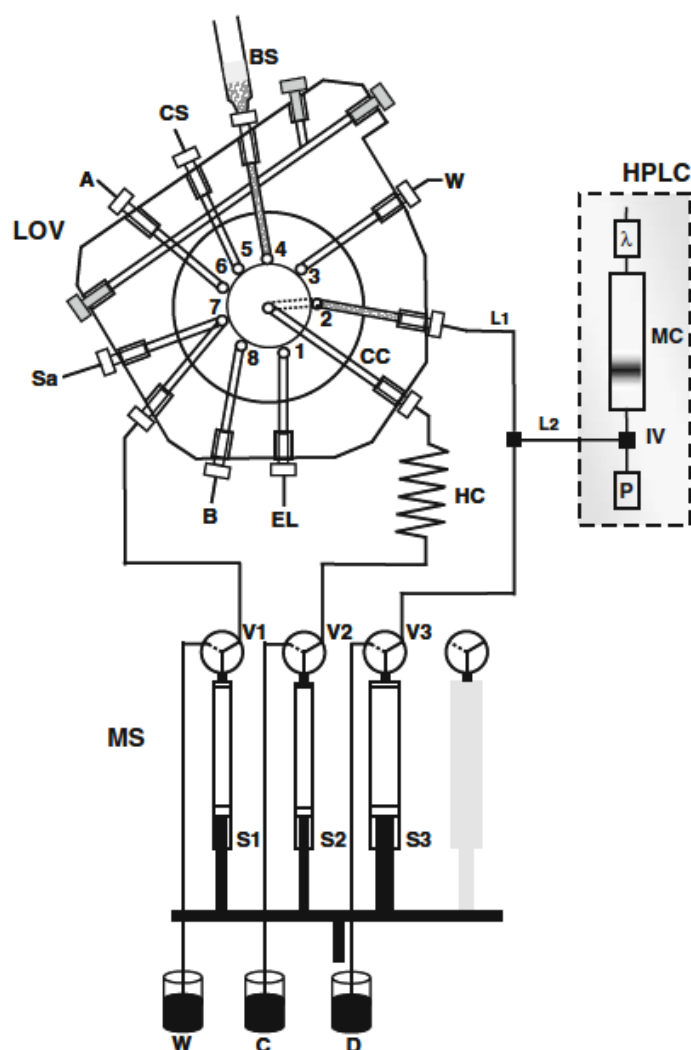


Figura 1.2. Representação esquemática do sistema hifenizado MSFIA-HPLC [24].  $\lambda$  detector de díodos; A, ar; B, canal para descarte das partículas sólidas; BS, suspensão das partículas sólidas em solvente de condicionamento; C, transportador ( $H_2O$ ); CC, canal central; CS, solvente de condicionamento (50% v/v MeOH/ $H_2O$ ); D, diluente ( $H_2O$ ); EL, eluente (50% v/v MeOH/ $H_2O$  + 1% v/v  $CH_3COOH$ ); HC, reator de armazenamento ("holding coil"); HPLC, cromatógrafo líquido de alta eficiência; IV, válvula de injeção; L1, ligação (8 cm); L2, ligação (44 cm); LOV, "lab-on-valve"; MC, coluna cromatográfica monolítica; MS, multi-seringa; P, bomba; Sa, solução de amostra/padrão; Si, seringa; Vi, válvula de comutação de três vias (linha a tracejado corresponde à posição "off" e linha sólida corresponde à posição "on"); W, esgoto. Copyright 2010 Springer-Verlag.

As características da metodologia proposta permitiram um elevado controlo dos diferentes passos no protocolo de extracção, o que é essencial para promoção das interacções selectivas nas cavidades do polímero de impressão molecular. Foi possível extrair e quantificar a riboflavina em diferentes amostras alimentares no intervalo entre 0,450 e 5,00 mg L<sup>-1</sup> após o processamento de um volume de amostras de 1,0 mL sem qualquer pré-tratamento inicial. Para as amostras de leite infantil, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram 0,05 e 0,17 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O método foi aplicado com sucesso a dois materiais de referência certificados e a repetibilidade obtida foi elevada (DPR < 5,5 %). O protocolo de preparação e extracção da amostra acoplado à posterior análise cromatográfica constituem um sistema simples, económico e que proporciona um ritmo de determinação de seis amostras h<sup>-1</sup>.

### 1.3. Determinação da capacidade antioxidante

#### 1.3.1. Métodos baseados na capacidade antioxidante total

Os antioxidantes, incluindo os compostos polifenólicos, as vitaminas E e C e os carotenóides, são considerados nutrientes eficientes na prevenção de doenças relacionadas com o stress oxidativo. Este factor despertou o interesse da comunidade científica, tendo já sido publicados diversos artigos científicos relacionados, sendo que, na última década este número quase que quadruplicou [25]. O significado lato da palavra antioxidante é “uma substância que impede oxidação ou inibe reacções promovidas pelo oxigénio e peróxido, etc.”, mas para a bioquímica e medicina, os antioxidantes “são enzimas ou outros compostos endógenos, como a glutathione na forma reduzida, ou outros compostos oriundos da dieta, como a vitamina E ou o  $\beta$ -caroteno, que são capazes de eliminar os efeitos nocivos da oxidação de tecidos animais”, enquanto que na área alimentar são considerados “substâncias presentes nos alimentos que diminuem significativamente os efeitos adversos de espécies reactivas, como as espécies reactivas de oxigénio e azoto (ROS do inglês “reactive oxygen species” e RNS do inglês “reactive nitrogen species”), na função fisiológica normal dos humanos” [25]. A formação de espécies reactivas (ROS e RNS) causa deterioração de produtos alimentares e já foi relacionada com a génese de diversas patologias, tais como a aterosclerose, a inflamação crónica e alguns tipos de cancro, entre outras [26].



A determinação da capacidade antioxidante e dos constituintes dos alimentares responsáveis por esta actividade passou a ser um assunto de elevado interesse em investigação. No entanto, a determinação de cada composto antioxidante e o seu estudo individual é demasiado dispendioso e pouco eficiente devido à complexidade das matrizes alimentares [25]. É de todo o interesse conceber um método que seja prático, eficiente e rápido para quantificar a capacidade antioxidante. Existem variados métodos para determinação deste parâmetro, sendo que estes diferem entre si em termos de mecanismos de reacção, espécies oxidativas alvo, condições de reacção e a forma em que os resultados são expressos [27]. Embora os métodos separativos como a electrofórese capilar e a cromatografia líquida de alta eficiência, acoplados a detectores multi-dimensionais como UV com varrimento de díodos ou espectrometria de massa, sejam técnicas poderosas para o isolamento e identificação de compostos fenólicos em amostras complexas, a aplicação para a estimativa do conteúdo fenólico total pode ser imprecisa [28]. Para além disso, são técnicas morosas, dispendiosas e não são adequadas para determinações de rotina. Visto que a capacidade antioxidante total está dependente de diversos factores é recomendável que se usem vários métodos que avaliem diferentes aspectos do comportamento antioxidante para produzir um perfil antioxidante completo. É também vantajoso seleccionar métodos que estejam validados e padronizados com resultados publicados comparáveis na literatura.

Em termos gerais os métodos podem dividir-se em dois grandes grupos: (i) métodos específicos para espécies com relevância biológica, envolvendo espécies reactivas de oxigénio e de azoto e (ii) métodos para avaliação da capacidade redutora baseada na transferência de electrões. Este último grupo reúne métodos que recorrem a espécies radicalares, não biológicas e estáveis, tais como o ABTS<sup>•+</sup> (catião radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) [29] ou o DPPH<sup>•</sup> (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) [30,31]. Neste último grupo também estão representados os métodos que medem a capacidade redutora total através de reacções redox (método FRAP, do inglês "ferric reducing antioxidant power") [32,33] e o método de Folin-Ciocalteu (FC) [34,35] ou através da aplicação de métodos electroquímicos [36,37]. As principais características destes métodos estão descritas na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Principais características dos métodos específicos para radicais estáveis e não biológicos e para avaliação da capacidade de redução total [27].

Método	Princípio da medição	Quantificação
ABTS <sup>•+</sup> /TEAC	O radical catião ABTS <sup>•+</sup> é reduzido por antioxidantes, causando uma diminuição da absorvância a 414 ou 734 nm	Equivalentes de Trolox ( $\mu\text{M}$ ), equivalentes de ácido ascórbico (mg/100 mL ou 100 g)
DPPH <sup>•</sup>	O radical DPPH <sup>•</sup> é reduzido por antioxidantes, originando uma diminuição da absorvância a 515 nm	Equivalentes de EC <sub>50</sub> , RSE, Trolox ( $\mu\text{M}$ ), equivalentes de ácido ascórbico (mg/100 mL ou 100 g)
FRAP	O complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina é reduzido por antioxidantes, causando um aumento de absorvância a 593 nm	Equivalentes de iões ferro, equivalentes de ácido ascórbico
Folin-Ciocalteu	Os complexos de tungsténio-molibdato são reduzidos por antioxidantes, causando um aumento de absorvância a 750 nm	Equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Capacidade de redução electroquímica total	A intensidade da corrente anódica é aumentada devido à oxidação dos compostos antioxidantes na superfície do eléctrodo	Potencial de oxidação ( $E_{1/2}$ ), intensidade da corrente anódica ( $I_a$ ), área abaixo da onda anódica

Nota: ABTS<sup>•+</sup> catião radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), DPPH<sup>•</sup> radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, EC<sub>50</sub> concentração eficiente, FRAP (do inglês "ferric reducing antioxidant power") poder de redução antioxidante férrica, RSE (do inglês "radical scavenging efficiency") eficiência de sequestro radicalar, TEAC (do inglês "Trolox equivalent antioxidant capacity") capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox.

### 1.3.2. Capacidade antioxidante baseada no método de Folin-Ciocalteu

O reagente de Folin-Ciocalteu (FC) não tem uma natureza química bem definida, mas sabe-se que é constituído por complexos ácidos de fosfomolibdénio/fosfotungsténio [35] e a química que está por detrás do método de Folin-Ciocalteu baseia-se na transferência de electrões em meio alcalino dos compostos fenólicos e outras espécies redutoras para o molibdénio, originando complexos azuis que podem ser detectados por espectrofotometria a um comprimento de onda situado no intervalo 750-765 nm [34]. Geralmente o ácido gálico é usado como composto padrão, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico, em  $\text{mg L}^{-1}$ . O reagente FC não é específico para os compostos fenólicos, visto que pode ser reduzido por diversos compostos não fenólicos, como por exemplo as aminas aromáticas, o dióxido de enxofre, o ácido ascórbico, entre outros, e por esta razão não é aplicável para a determinação de conteúdo total fenólico, a não ser que se removam ou eliminem as espécies interferentes [34,38]. Apesar desta indicação química, é muito frequente encontrar nas revistas

científicas periódicas da área da Química Alimentar artigos em que o método de Folin-Ciocalteu é usado para a determinação da quantidade total de compostos fenólicos.

Na realidade R. L. Prior e co-autores propuseram o método Folin-Ciocalteu como método de referência para avaliação da capacidade antioxidante total [38]. Num trabalho recente, a capacidade de redução do FC aplicada numa grande quantidade de bebidas (72) foi comparada com o método TEAC e obteve-se uma boa correlação ( $R > 0,9$ ) para vinhos tintos, infusões de ervas e de chás e cervejas [27]. Este é apenas um estudo entre muitos que correlacionam favoravelmente o método de Folin-Ciocalteu com outros frequentemente utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante.

#### 1.4. Enquadramento e objectivos

O objectivo principal do trabalho é a determinação de compostos fenólicos como contribuintes para a capacidade antioxidante em amostras alimentares. Conforme mencionado na secção anterior, o método de Folin-Ciocalteu é frequentemente aplicado de forma incorrecta à determinação do conteúdo total de compostos fenólicos em amostras alimentares. Recentemente, foi proposto um método que permite a aplicação desta reacção à determinação de compostos fenólicos recorrendo à extracção em fase sólida para remoção de interferentes, tendo sido aplicado a amostras de urina [39].

Dado que tal procedimento não está descrito para a área alimentar, pretende-se a implementação do mesmo recorrendo a um sistema automático baseado em LOV-BI que seja capaz de separar os compostos fenólicos presentes em amostras alimentares para posterior quantificação através do método de Folin-Ciocalteu. Pretende-se também avaliar o conteúdo em termos percentuais de compostos fenólicos que contribuem para a capacidade redutora total estimada pelo método de Folin-Ciocalteu, obtida pela análise directa de amostras através deste método.

## **Material e métodos**

## 2. Material e métodos

Nesta secção descrevem-se os procedimentos utilizados na preparação de soluções necessárias para a execução experimental da metodologia analítica, bem como o equipamento utilizado na montagem do sistema de fluxo. Também é descrito em detalhe o protocolo adoptado para o procedimento automático de extracção em fase sólida.

### 2.1. Reagentes e soluções

Na preparação das soluções utilizaram-se reagentes de qualidade *pro analysis* sem qualquer tratamento ou purificação adicional.

Para a preparação de soluções aquosas utilizou-se água ultra-pura (resistividade superior a 18 M $\Omega$  cm).

As soluções padrão foram obtidas por pesagem rigorosa do respectivo reagente sólido numa balança analítica (modelo AG 285, Mettler Toledo), seguida de dissolução do mesmo em solvente adequado e subsequente diluição, em balões volumétrico.

Os padrões utilizados na construção das curvas de calibração foram obtidos por diluição rigorosa, em água ultra-pura, da solução padrão mais concentrada, usando micro-pipeta regularmente calibrada (modelo LABMATE, HTL) e balões volumétricos.

Quando necessário, ajustou-se o pH das soluções utilizando para o efeito um milivoltímetro da marca Crison (Allela, Spain), modelo pH-meter GLP 22, equipado com um eléctrodo de vidro da mesma marca, modelo 52-02.

Todas as soluções utilizadas no sistema de fluxo foram previamente desgaseificadas no ultra-sons.

#### 2.1.1. Soluções usadas na preparação das amostras/padrões

- Solução de ácido clorídrico 0,6 M: diluíram-se 5,9 mL de ácido clorídrico a 32% (m/V) em 100 mL de água, numa proveta.
- Solução de ácido clorídrico 10 mM: diluíram-se 4,2 mL de ácido clorídrico 0,6 M até um volume total de 250 mL, utilizando água como solvente.

- Solução de ácido clorídrico 5 mM: diluíram-se 25 mL de ácido clorídrico 10 mM até um volume total de 50 mL, utilizando água como solvente.

#### 2.1.2. Preparação das soluções padrão

- Solução mãe padrão de ácido gálico 500 mg L<sup>-1</sup>: dissolveram-se 25,00 mg de ácido gálico em cerca de 10 mL de água, subsequentemente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com água. Esta solução foi preparada mensalmente.

- Solução mãe padrão de ácido cafeico 500 mg L<sup>-1</sup>: dissolveram-se 25,00 mg de ácido cafeico em cerca de 10 mL de uma solução 50% (v/v) etanol/água ultra-pura subsequentemente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com o mesmo solvente.

- Solução mãe padrão de galhato de octilo 500 mg L<sup>-1</sup>: dissolveram-se 25,00 mg de galhato de octilo em cerca de 10 mL de uma solução 50% (v/v) etanol/água ultra-pura subsequentemente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com o mesmo solvente.

- Solução mãe padrão de quercetina 500 mg L<sup>-1</sup>: dissolveram-se 25,00 mg de quercetina em cerca de 10 mL de etanol, subsequentemente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com o mesmo solvente.

- Solução mãe padrão de ácido tânico 500 mg L<sup>-1</sup>: dissolveram-se 25,00 mg de ácido tânico em cerca de 10 mL de uma solução 50% (v/v) etanol/água ultra-pura subsequentemente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com o mesmo solvente.

- Solução mãe padrão de ácido ascórbico 500 mg L<sup>-1</sup>: dissolveram-se 25,00 mg de ácido ascórbico em cerca de 10 mL de água, subsequentemente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com água.

- Soluções padrão de ácido gálico, ácido cafeico, galhato de octilo, quercetina, ácido tânico e ácido ascórbico (5 mg L<sup>-1</sup>): Pipetaram-se 250 µL da solução mãe padrão do respectivo composto (500 mg L<sup>-1</sup>) com uma micro-pipeta e diluiu-se até à marca num balão volumétrico de 25 mL, com ácido clorídrico 10 mM.

### 2.1.3. Preparação das amostras

- Amostra de vinho (1:20): pipetou-se 1,00 mL da amostra de vinho para um balão volumétrico de 20 mL, cujo volume foi completo com ácido clorídrico 10 mM.
- Amostra de vinho (1:500): pipetou-se 2,00 mL da amostra de vinho diluída previamente (1:20) para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com ácido clorídrico 10 mM.
- Amostra de sumo (1:50): pipetou-se 1,00 mL da amostra de sumo para um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completo com ácido clorídrico 10 mM.

### 2.1.4. Soluções usadas no sistema LOV-BI

- Suspensão de Oasis<sup>TM</sup> HLB (Waters Inc. Milford, Massachusetts): 100 mg de Oasis<sup>TM</sup> HLB em 1000 µL de metanol.
- Solução de metanol 50% (v/v): misturaram-se volumes iguais (10 mL) de água e metanol.
- Solução de amoníaco 10% (v/v): diluíram-se 10 mL de solução comercial de amoníaco 25% (m/v) numa proveta de 100 mL usando água como solvente.
- Solução de metanol 50% (v/v) e hidróxido de amónio 5% (v/v): misturaram-se volumes iguais (10 mL) de metanol p.a. e solução de amoníaco 10% (v/v).
- Solução de hidróxido de sódio 0,5 M: dissolveram-se 2,0 g de hidróxido de sódio em 100 mL de água.
- Solução de hidróxido de sódio 10 mM: diluíram-se 2,0 mL da solução de hidróxido de sódio 0,5 M numa proveta de 100 mL usando água como solvente.
- Solução de metanol 50% (v/v) e /hidróxido de sódio 5 mM: misturaram-se volumes iguais (10 mL) de metanol p.a. e solução de hidróxido de sódio 10 mM.

### 2.1.5. Soluções usadas no método Folin-Ciocalteu

- Solução de Folin-Ciocalteu (1:5): diluíram-se 5,0 mL da solução comercial de Folin-Ciocalteu (2 N em acidez) num balão volumétrico de 25 mL usando água como solvente.

- Solução de hidróxido de sódio 0,35 M: dissolveram-se 1,4 g de hidróxido de sódio em 100 mL de água.
- Solução tampão de carbonato de sódio ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ): Dissolveram-se 6,0 g de carbonato de sódio em 100 mL de água e ajustou-se o pH para 10,0 por adição gota a gota de ácido clorídrico concentrado.

## 2.2. Instrumentação

A montagem referente ao sistema de fluxo é constituída por um módulo multi-seringa, por um módulo LOV e por um computador, cujo software (construído em QuickBasic 4.5) permite controlar os dois módulos referidos através de uma interface do tipo RS232 (Figura 2.1).



Figura 2.1. Montagem laboratorial do sistema de fluxo constituída pelos módulos multi-seringa e da lab-on-valve e pelo computador.

O módulo multi-seringa é da marca Crison (Allela, Spain, modelo BU 4 S) e está equipado com uma seringa de vidro (Microliter, Hamilton) na posição 3 com capacidade de  $2500 \mu\text{L}$  e êmbolos e ligadores em politetrafluoroetileno (PTFE do inglês



polytetrafluoroethylene). O êmbolo da seringa percorre na totalidade 10000 passos, fixando o volume mínimo dispensado/aspirado em 0,25  $\mu\text{L}$  (Figura 2.2). As restantes posições do módulo multi-seringa não foram utilizadas.

O módulo LOV, também da marca Crison (modelo VA 2 SW), contém duas válvulas de selecção de oito portas. Numa das válvulas foi retirada a peça exterior móvel, tendo sido esta substituída por uma peça monolítica constituída por polieterimida com 10 microcanaís gravados na mesma (Ideia.M., Porto, Portugal), ajustada ao rotor da válvula modificada (Figuras 2.2 e 2.3).

A tubagem utilizada no sistema de fluxo e na ligação das portas aos recipientes de soluções é em PTFE (Omnifit, Cambridge, UK), com diâmetro interno de 0,8 mm. O tubo que constitui o reactor de armazenamento, que estabelece a ligação entre os módulos LOV e multi-seringa é também em PTFE e tem diâmetro interno de 1,6 mm (Figuras 2.2 e 2.3). Outros ligadores, utilizados nas portas do dispositivo LOV ou na válvula solenóide do módulo multi-seringa, também são em PTFE.



Figura 2.2. Módulos LOV e multi-seringa usados para a extracção de compostos fenólicos.

As leituras de absorvância oriundas da aplicação do método de Folin-Ciocalteu foram efectuadas num leitor de micro-placas (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski VT), ao qual esteve associado o software de aquisição e registo de dados Gen5 1.08 (Figura 2.3).

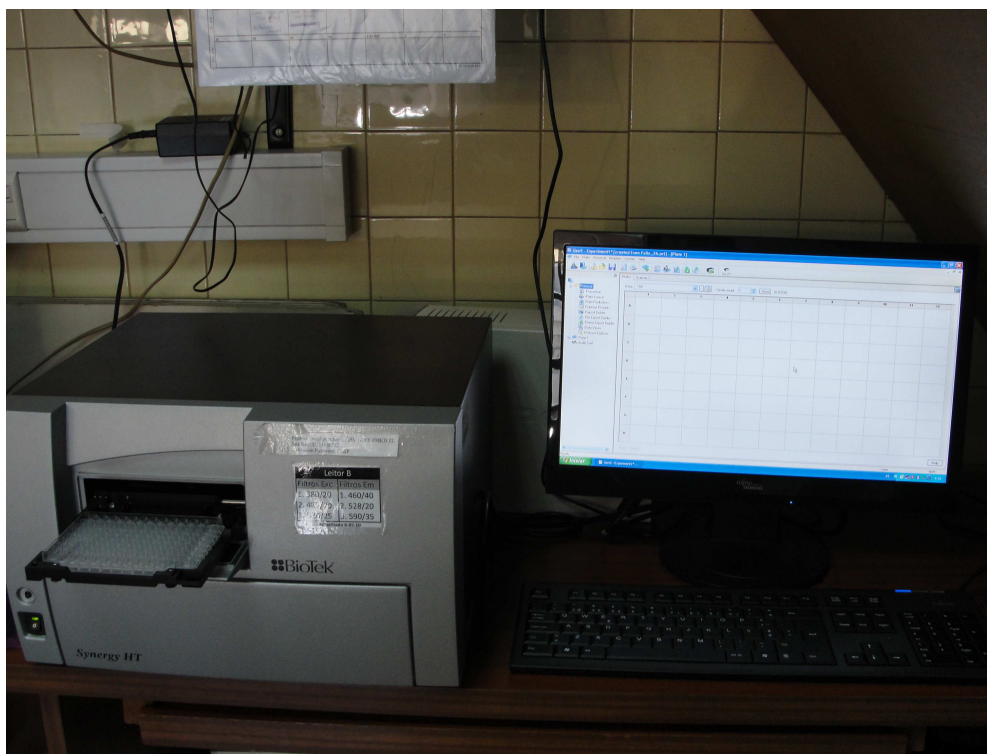


Figura 2.3. Leitor de micro-placas e computador.

### 2.3. Procedimento automático de extracção em fase sólida

A válvula LOV-BI apresenta 10 portas (Figura 3.4). Na porta/canal 1 é onde são retidas as partículas que constituem a fase sólida, ocorrendo o empacotamento das mesmas e a formação da coluna, através da qual passa a amostra e ficam retidos os compostos fenólicos, e na qual se fará a recolha das alíquotas a analisar. As partículas sólidas são Oasis<sup>TM</sup> HLB, com tamanho médio de 30  $\mu\text{m}$  e tamanho de poro de 80 Å. A amostra é enviada para o sistema através da porta 2. O ar entra no sistema pela porta 3 (que é constituída por dois canais interligados). Na porta 4 está encaixada uma ponta de micro-pipeta onde é colocada a suspensão das partículas de Oasis<sup>TM</sup> HLB para posterior aspiração das mesmas e envio para a porta 1. Na porta 5 está o recipiente com o solvente de condicionamento das partículas sólidas (50 % metanol/50 % água). A porta 6 está livre e foi fechada na sua extremidade com uma peça adequada. O eluente é

aspirado através da porta 7. Na porta 8 foi colocado o esgoto. Entre as portas 6 e 7 está a porta c, que corresponde ao canal central e que está ligada ao reactor de armazenamento e, consequentemente, à seringa do módulo multi-seringa. Nas secções seguintes é feita uma descrição detalhada de todo o protocolo experimental aplicado para a extracção em fase sólida dos compostos fenólicos.

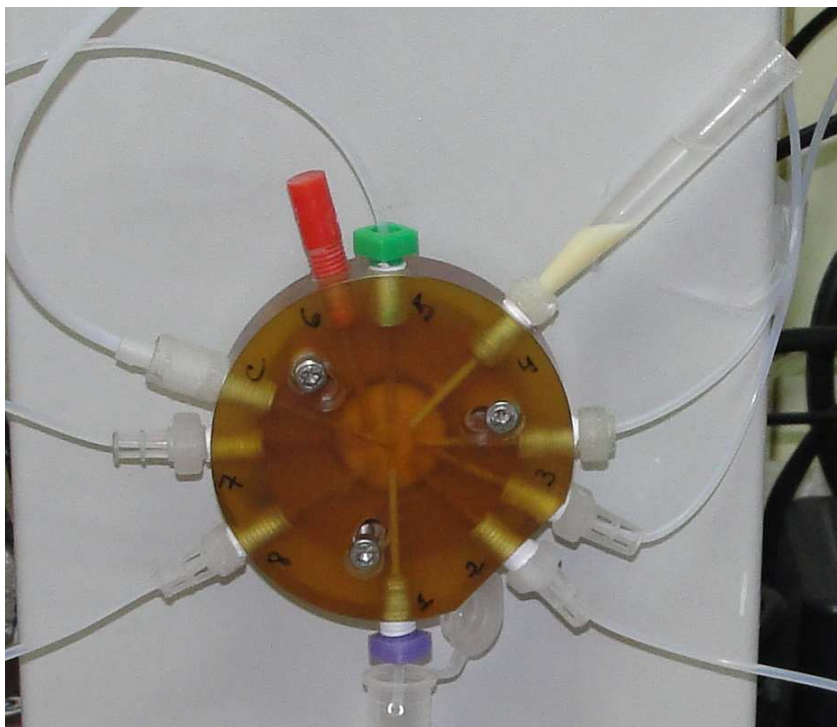


Figura 2.4. Vista pormenorizada da válvula LOV e respectivas portas/canais. Porta 1, coluna de extracção em fase sólida; porta 2, amostra; porta 3 (dupla), ar; porta 4, reservatório da fase sólida; porta 5, solvente de condicionamento; porta 6, não utilizada, encontrando-se fechada; porta 7, eluente; porta 8, esgoto; porta c, canal central.

### 2.3.1. Formação da coluna extractora e condicionamento do adsorvente

Primeiramente aspiram-se 550  $\mu\text{L}$  do solvente de condicionamento (50% (v/v) metanol/água) a um caudal de  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ , ligando o canal central à porta 5. Inverte-se o sentido da seringa para propulsão e enviam-se 125  $\mu\text{L}$  do solvente de condicionamento para a porta 4, onde se encontra a suspensão de partículas Oasis<sup>TM</sup>, e faz-se a ressuspensão das mesmas a um caudal de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . De seguida, invertendo o sentido do movimento da seringa, enche-se a mesma com um volume de 1050  $\mu\text{L}$  de transportador (água ultra-pura) a um caudal de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , aspirando directamente do recipiente de transportador. Aspiram-se seguidamente 175  $\mu\text{L}$  da suspensão das

partículas sólidas a um caudal de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  e, após mudança do canal central para a porta 1 e inversão do sentido do fluxo, enviam-se  $1000 \mu\text{L}$  a um caudal de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , formando e condicionando assim a coluna. As partículas excedentes são enviadas para o esgoto (porta 8) a um caudal de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . Na tabela 2.1 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente ao carregamento das partículas adsorventes e condicionamento da coluna.

Tabela 2.1. Protocolo experimental do carregamento das partículas adsorventes e condicionamento da coluna.

Descrição	Porta	Volume	Caudal	Sentido	Posição
Aspiração metanol (50%)	5	550	2,5	a	1
Ressuspensão dos “beads”	4	125	5	b	1
Enchimento das seringas	4	1050	5	a	0
Aspiração dos “beads”	4	175	0,5	a	1
Formação e condicionamento da coluna	1	1000	2	b	1
Rejeição dos “beads” em excesso	8	650	5	b	1

### 2.3.2. Carregamento da amostra e remoção da matriz

Após ligação do canal central à porta 3, aspiram-se  $250 \mu\text{L}$  de ar a um caudal de  $2 \text{ mL min}^{-1}$  para o reactor de armazenamento. De seguida, muda-se para a porta 2 e aspiram-se  $1000 \mu\text{L}$  de amostra a um caudal de  $2 \text{ mL min}^{-1}$  também para o reactor de armazenamento. O passo seguinte é o de enviar, após inversão do fluxo,  $150 \mu\text{L}$  do transportador directamente para o reservatório do mesmo, para posicionamento da seringa. O canal central é ligado à porta 1 e enviam-se  $1100 \mu\text{L}$  de amostra e ar a um caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , fazendo ainda a recolha da primeira alíquota para um *eppendorf* que será selado no final com película plástica. Enche-se a seringa com  $1500 \mu\text{L}$  directamente a partir do reservatório do transportador e, ligando o canal central à porta 8, lava-se o canal central, fazendo passar o volume aspirado de transportador para o esgoto. Realiza-se, então, a reposição da seringa com  $500 \mu\text{L}$  de transportador a um caudal de  $5 \text{ mL min}^{-1}$  e envia-se o mesmo volume a um caudal de  $2 \text{ mL min}^{-1}$  para o canal da porta 1, removendo assim a matriz da amostra. Neste passo inicia-se a recolha da segunda alíquota. Mantendo o *eppendorf* no canal 1, faz-se uma paragem do sistema durante cerca de 15 segundos. De seguida, aspiram-se  $300 \mu\text{L}$  de ar a um caudal de  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , ligando o canal central à porta 3, e invertendo o sentido da seringa, enviam-se  $200 \mu\text{L}$  de ar para a porta 1, terminando a recolha da segunda alíquota. Os  $100 \mu\text{L}$  que restam são enviados directamente para o reservatório do transportador posicionando, assim, a seringa. Os passos realizados neste ciclo estão apresentados na tabela 3.2.

Tabela 2.2. Protocolo experimental do carregamento da amostra e remoção da matriz.

Descrição	Porta	Volume	Caudal	Sentido	Posição
Aspiração do ar	3	250	2	a	1
Aspiração da amostra	2	1000	2	a	1
“Dummy step”	2	150	5	b	0
Envio amostra para a coluna	1	1100	1	b	1
Enchimento da seringa	1	1500	5	a	0
Lavagem do canal central	8	1500	5	b	1
Reposição da seringa	1	500	5	a	0
Remoção da matriz	1	500	2	b	1
Paragem do sistema	1	1250	5	e	1
Aspiração do ar	3	300	5	a	1
Envio do ar	1	200	1	b	1
Posicionamento do pistão	1	100	5	b	0

### 2.3.3. Eluição dos compostos retidos no adsorvente

Em primeiro lugar, enchem-se as seringas directamente a partir do reservatório do transportador com um volume de 1150  $\mu\text{L}$  a um caudal de 5  $\text{mL min}^{-1}$ . De seguida, move-se o canal central para a porta 3 e aspiram-se 200  $\mu\text{L}$  de ar (2  $\text{mL min}^{-1}$ ). Aspiram-se, então, 300  $\mu\text{L}$  de eluente a um caudal de 2  $\text{mL min}^{-1}$  a partir da ligação à porta 7. Mantendo o canal central na porta 7, enviam-se 250  $\mu\text{L}$  de transportador a 5  $\text{mL min}^{-1}$  directamente para o reservatório do mesmo. Seguidamente, inicia-se a eluição e recolha da terceira alíquota para um *eppendorf*, enviando para o canal da porta 1 um volume da mistura eluente/ar de 400  $\mu\text{L}$  a 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Segue-se uma paragem do sistema durante 15 segundos para aguardar a recolha de todo o volume da mistura eluente/analitos e no final, pipetam-se 200  $\mu\text{L}$  deste volume para outro *eppendorf* com 200  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico a uma concentração de 5 mM, neutralizando, deste modo, a alíquota recolhida. Move-se o canal central para a porta 8 e enviam-se os 1000  $\mu\text{L}$  excedentes para o esgoto a um caudal de 5  $\text{mL min}^{-1}$ . Este ciclo é repetido e obtém-se a quarta alíquota correspondente à segunda eluição dos analitos, que eventualmente não tenham sido eluídos da primeira vez. Na tabela 2.3 apresenta-se o programa experimental da eluição dos analitos.

Tabela 2.3. Protocolo experimental da eluição dos compostos retidos no adsorvente.

Descrição	Porta	Volume	Caudal	Sentido	Posição
Enchimento da seringa	1	1150	5	a	0
Aspiração do ar	3	200	2	a	1
Aspiração do eluente	7	300	2	a	1
“Dummy step”	7	250	5	b	0
Eluição do analito	1	400	0,5	b	1
Paragem do sistema	1	1250	5	e	1
Lavagem do canal central	8	1000	5	b	1

#### 2.3.4. Descarte das partículas de Oasis™ HLB

Aspiram-se 1000  $\mu\text{L}$  de transportador directamente do reservatório a um caudal de 5  $\text{mL min}^{-1}$  para enchimento da seringa. De seguida, move-se o canal central para a porta 5 e são aspirados 250  $\mu\text{L}$  do solvente de condicionamento a 2,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Invertendo o sentido da seringa e ligando o canal central à porta 1, enviam-se 200  $\mu\text{L}$  do solvente aspirado a um caudal de 2  $\text{mL min}^{-1}$  para humedecimento das partículas de Oasis™ HLB empacotadas. Invertendo novamente o sentido, aspiram-se as partículas de Oasis™ HLB empacotadas para o reactor de armazenamento, num volume total de 500  $\mu\text{L}$  a um caudal de 5  $\text{mL min}^{-1}$ . Segue-se o descarte de 1350  $\mu\text{L}$  da suspensão de partículas a 5  $\text{mL min}^{-1}$ , mudando o canal central para a porta 8 (esgoto) e invertendo o sentido da seringa para propulsão. O canal central desloca-se para a porta 1 e os restantes 200  $\mu\text{L}$  são enviados para o canal para realizar a limpeza do mesmo. A descrição dos passos referentes ao descarte das partículas de Oasis™ HLB e limpeza do canal da coluna apresenta-se na tabela 2.4.

O sistema encontra-se, então, preparado para a execução de uma nova experiência.

Tabela 2.4. Protocolo experimental correspondente ao descarte das partículas de Oasis™ HLB e limpeza do canal da coluna.

Descrição	Porta	Volume	Caudal	Sentido	Posição
Enchimento da seringa	5	1000	5	a	0
Aspiração de metanol (50%)	5	250	2,5	a	1
Envio de metanol sobre a fase sólida	1	200	2	b	1
Aspiração da fase sólida	1	500	5	a	1
Descarte da fase sólida	8	1350	5	b	1
Limpeza do canal da coluna	1	200	2	b	1

#### 2.4. Procedimento para avaliação da capacidade redutora pelo método de Folin-Ciocalteu

A avaliação da capacidade antioxidante redutora total e a quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas com base no método de Folin-Ciocalteu realizado de forma clássica [34], e também com base no método de Folin-Ciocalteu modificado [40]. O primeiro método consiste na leitura da absorvância dos 96 poços de uma micro-placa, num leitor apropriado a um comprimento de onda de 760 nm, durante 2 horas, fazendo leituras de 10 em 10 minutos e à temperatura ambiente. O método modificado é semelhante ao primeiro, exceptuando o facto da leitura da micro-placa ser realizada durante 10 minutos, com leituras espaçadas de 1 minuto, visto que a reacção ocorre de uma forma mais célere dada a utilização de um valor de pH mais elevado no meio reaccional. A micro-placa foi preparada colocando em cada poço 50  $\mu\text{L}$  da amostra ou da solução do padrão ou do respectivo branco (solvente da solução em causa), conforme o caso, em cada poço e adicionando de seguida 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:5. Seguidamente adicionam-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de hidróxido de sódio 0,350 M (método de Folin-Ciocalteu modificado) ou carbonato de sódio 60 g  $\text{L}^{-1}$  (método de Folin-Ciocalteu). Para cada amostra, solução padrão ou branco, fizeram-se 4 réplicas dentro do mesmo ensaio. A absorvância do complexo formado é, então, monitorizada durante 2 horas (de 10 em 10 minutos) ou durante 10 minutos, de minuto a minuto, consoante o método seleccionado.

Foram construídas curvas de calibração entre 2,5 e 37,5 mg  $\text{L}^{-1}$  de ácido gálico, procedendo-se a um ajuste linear da relação entre a absorvância e a concentração de ácido gálico. Em alguns casos foi necessário proceder a um ajuste polinomial (2ª ordem) utilizando apenas os valores obtidos para as concentrações iguais ou inferiores a 10 mg  $\text{L}^{-1}$ .

## **Resultados e Discussão**



### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Implementação do protocolo de extracção em fase sólida no sistema BI-LOV

A extracção em fase sólida tem como princípio a passagem de uma solução que contém o(s) analito(s) em estudo, através de um adsorvente em fase sólida, empacotado numa coluna, no qual ficarão retidos o(s) analito(s) enquanto que a matriz e interferentes serão removidos. Posteriormente, o(s) analito(s) serão arrastados pelo eluente e recolhidos para análise. No sistema automático, a fase sólida não é empacotada, mas está suspensa num solvente adequado, o metanol, numa das portas laterais do sistema. Primeiramente aspira-se o solvente de condicionamento e envia-se parte deste para a porta onde está a suspensão com a fase sólida. Este passo é necessário para eliminar possíveis aglomerados de partículas sólidas que se tenham formado e facilitar a sua aspiração. O caudal deverá ser o mais alto possível sem que cause sobrepressão na montagem física, fixado neste caso a  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , para que ocorra a agitação das partículas suspensas. O volume aspirado da suspensão deve ser suficiente para preencher completamente todo o canal onde se forma a coluna. Inicialmente, o volume de aspiração da suspensão era  $60 \text{ }\mu\text{L}$  mas este revelou-se insuficiente para preencher o canal, tendo sido aumentado para  $125 \text{ }\mu\text{L}$ . Com este volume o canal ficava visivelmente todo preenchido mas a quantidade de partículas sólidas não foi repetível entre experiências, facto que se traduziu numa baixa repetibilidade dos resultados obtidos na quantificação dos compostos fenólicos. Assim, este valor foi aumentado para  $175 \text{ }\mu\text{L}$  e foi possível preencher completamente o canal da coluna e ainda uma parte do canal central. Este excedente de fase sólida é descartado para o esgoto através do envio de transportador (água) utilizando o caudal máximo de forma a agilizar este passo. Por outro lado, é importante salientar que o caudal de envio da suspensão de fase sólida deverá ser baixo para que não ocorra sobrepressão do sistema e consequentemente perdas de solução pelas outras portas. Utilizando este processo para o empacotamento do adsorvente, é possível obter colunas contendo  $17,2 \pm 0,7 \text{ mg}$  de OASIS<sup>TM</sup> HLB [17].

No procedimento envolvendo colunas empacotadas convencionalmente, estas devem ser condicionadas com um solvente de condicionamento apropriado, fazendo passar um determinado volume do solvente através da coluna, de modo a humedecer a fase sólida e a ocupar todos os interstícios de ar existentes entre as partículas. No caso da coluna empacotada no micro-canal do dispositivo LOV, a coluna já está humedecida, sendo apenas necessário eliminar a porção de solvente orgânico (metanol) existente no meio de

ressuspensão e condicionamento. Tal é efectuado pela passagem de cerca de 500  $\mu\text{L}$  de água no penúltimo passo desta parte do protocolo automático. Considerando todos os passos descritos na tabela 2.1, esta parte do ciclo de preparação da amostra demora cerca de 1,5 minutos.

A etapa seguinte do ciclo analítico engloba o envio da amostra para a coluna e eliminação da matriz. Este é o ciclo que demora mais tempo (cerca de 3,5 minutos) pelo facto de se enviar um volume considerável de amostra (1000  $\mu\text{L}$ ) para a coluna a um caudal relativamente baixo ( $1 \text{ mL min}^{-1}$ ) e por ser o que tem maior número de passos. O primeiro passo consiste em aspirar ar para evitar a acumulação de vestígios de amostra nas tubagens e no transportador, eliminando assim contaminações entre experiências. O caudal de aspiração do ar não deverá ser elevado para, mais uma vez, acautelar sobrepressão no sistema. A amostra é também aspirada a um caudal relativamente baixo para não haver formação de bolhas. Durante o envio da amostra através da coluna, é recolhida a primeira alíquota analisada pelo método de Folin-Ciocalteu de forma a quantificar o(s) composto(s) não-retido(s) no adsorvente. Antes de proceder à remoção da matriz é necessário eliminar restos de amostra existentes no canal central para o esgoto. A remoção da matriz é realizada enviando transportador (água) que eliminará os compostos não retidos na coluna, tal como na extracção em fase sólida realizada de forma convencional. O caudal deste passo também deverá ser baixo para não causar sobrepressão no sistema de fluxo. Segue-se uma paragem do fluxo durante 15 segundos. Aspira-se novamente ar e envia-se o mesmo através da coluna com vista a eliminar completamente vestígios de matriz e água que estivessem no canal, para que estes não interfiram no passo da eluição. Durante estes dois passos é recolhida a alíquota contendo o(s) composto(s) eventualmente pré-eluídos, quantificados posteriormente pelo método de Folin-Ciocalteu.

O ciclo de eluição dos compostos retidos no adsorvente inicia-se com o enchimento da seringa e a aspiração do ar e de eluente. O ar terá como função ajudar à recuperação total do volume de eluente enviado através da coluna, e o caudal deve ser o mais baixo possível para evitar sobrepressão do sistema. Durante estes passos é efectuada a recolha do eluato para posterior determinação dos compostos retidos através do método de Folin-Ciocalteu. Existe também uma paragem do fluxo durante 15 segundos e o volume que resta na seringa é enviado para o esgoto para limpeza do canal central. A duração deste ciclo é de cerca de 2 minutos.

O último ciclo é o da remoção da fase sólida do micro-canal situado no dispositivo LOV. Primeiramente é necessário humedecer novamente a fase sólida com o solvente de

condicionamento, de forma a facilitar a sua remoção. Aspira-se então a fase sólida humedecida e envia-se para o esgoto. Durante a aspiração da fase sólida deverá ser colocado um gobelé com metanol na extremidade do canal 1 para ajudar à total remoção da mesma e impedindo a sua secagem. No final deverá ser enviada água pelo canal para limpeza do mesmo e para preparar o sistema para a extracção da próxima amostra. A duração deste ciclo é de cerca de meio minuto.

### 3.2. Estudo das condições do processo de extracção

#### 3.2.1. Estudo do perfil de não-retenção (“breakthrough”)

Esta experiência teve como objectivo o estudo do perfil de não-retenção (“breakthrough”) de um composto fenólico modelo, neste caso o ácido gálgico, em diferentes condições de alimentação da amostra. Para o efeito, foi utilizada uma solução padrão de ácido gálgico ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) preparada em três solventes diferentes: solução tampão de ácido acético/acetato de sódio 10 mM a pH 4,5 (ensaios A e D), HCl 10 mM (ensaios B e E) e água (ensaio C). Também foi objectivo desta experiência avaliar o efeito do transportador na pré-eluição do composto-alvo durante a etapa de remoção da matriz, tendo sido usados água (ensaios A, B e C) ou HCl 10 mM (ensaios D e E) como transportador/solução de lavagem. O eluente foi o mesmo em todos os ensaios: 100% metanol. O ciclo de carregamento da amostra foi realizado cinco vezes, de onde se recolheram as alíquotas 1 a 5 e de seguida procedeu-se à remoção da matriz (alíquota 6). O ciclo de eluição realizou-se apenas uma vez e recolheu-se a alíquota 7. Esta informação está resumida nas tabelas 3.1 e 3.2.

As concentrações das soluções padrão usadas como “amostra” foram obtidas a partir da análise directa dos padrões utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu modificada implementada no leitor de micro-placas, tendo sido obtidos os valores de  $20,7 \text{ mg L}^{-1}$  (solução tampão de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaCH}_3\text{COO}$  10 mM a pH 4,5),  $21,6 \text{ mg L}^{-1}$  (HCl 10 mM) e  $20,5 \text{ mg L}^{-1}$  (água). Os valores obtidos para a concentração de ácido gálgico em cada alíquota obtida estão indicados na tabela 3.2. A partir destes valores foi calculada a massa não-retida por cada 1000  $\mu\text{L}$  de amostra alimentada à coluna (tabela 3.3), a massa pré-eluída durante o passo de remoção da matriz da amostra (tabela 3.4) e a massa eluída por passagem do eluente (tabela 3.4). Estes valores foram calculados por multiplicação da concentração obtida pelo volume recolhido para cada alíquota. As

percentagens correspondentes foram calculadas através do balanço mássico, a partir da concentração e dos volumes das soluções padrão usadas.

Tabela 3.1. Resumo das variáveis estudadas na experiência para a determinação do perfil de pré-eluição ("breakthrough") de uma solução contendo  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

		Ensaio				
		A	B	C	D	E
Solvente da amostra	solução tampão de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaCH}_3\text{COO}$ 10 mM a pH 4,5	✓			✓	
	HCl 10 mM		✓			✓
	água			✓		
Transportador usado	HCl 10 mM				✓	✓
	água	✓	✓	✓		

Tabela 3.2. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios A a E referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

			Ensaio				
alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	A	B	C	D	E
1	amostra alimentada (1)	1000	$8,2 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,1$
2	amostra alimentada (2)	1000	$15,9 \pm 0,3$	$9,0 \pm 0,6$	$14,1 \pm 0,3$	$16,1 \pm 0,3$	$13,4 \pm 0,4$
3	amostra alimentada (3)	1000	$18,6 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,1$	$17,3 \pm 0,4$	$18,9 \pm 0,3$	$18,3 \pm 0,2$
4	amostra alimentada (4)	1000	$19,1 \pm 0,5$	$17,8 \pm 0,2$	$18,5 \pm 0,3$	$19,5 \pm 0,4$	$19,4 \pm 0,5$
5	amostra alimentada (5)	1000	$19,2 \pm 0,2$	$18,6 \pm 0,4$	$18,8 \pm 0,2$	$18,6 \pm 0,7$	$14,2 \pm 0,2$
6	transportador usado na remoção da matriz	500	$11,5 \pm 0,1$	$24,2 \pm 0,4$	$16,0 \pm 0,2$	$7,5 \pm 0,2$	$13,9 \pm 0,2$
7	eluente	300	$35,4 \pm 0,7$	$65,4 \pm 1,7$	$36,6 \pm 0,4$	$38,0 \pm 1,2$	$45,8 \pm 0,9$

Tabela 3.3. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de  $1000 \mu\text{L}$  de uma solução de ácido gálico  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . Também são apresentados os valores correspondentes à massa total não-retida, à massa total retida após a passagem das 5 alíquotas de padrão e a percentagem de ácido gálico não-retido por alíquota (valores entre parênteses).

ensaio	massa alimentada à coluna por alíquota	massa não-retida					massa total não-retida	massa total retida
		alíquota 1	alíquota 2	alíquota 3	alíquota 4	alíquota 5		
A	20,7	8,2 (39,6%)	15,9 (76,8%)	18,6 (89,9%)	19,1 (92,3%)	19,2 (92,8%)	81,0	22,5
B	21,6	2,6 (12,0%)	9,0 (41,7%)	15,0 (69,4%)	17,8 (82,4%)	18,6 (86,1%)	63,0	45,0
C	20,5	6,3 (30,7%)	14,1 (68,8%)	17,3 (84,4%)	18,5 (90,2%)	18,8 (91,7%)	75,0	27,5
D	20,7	8,9 (43,0%)	16,1 (77,8%)	18,9 (91,3%)	19,5 (94,2%)	18,6 (89,9%)	82,0	21,5
E	21,6	4,5 (20,8%)	13,4 (62,0%)	18,3 (84,7%)	19,4 (89,8%)	14,2 (65,7%)	69,8	38,2

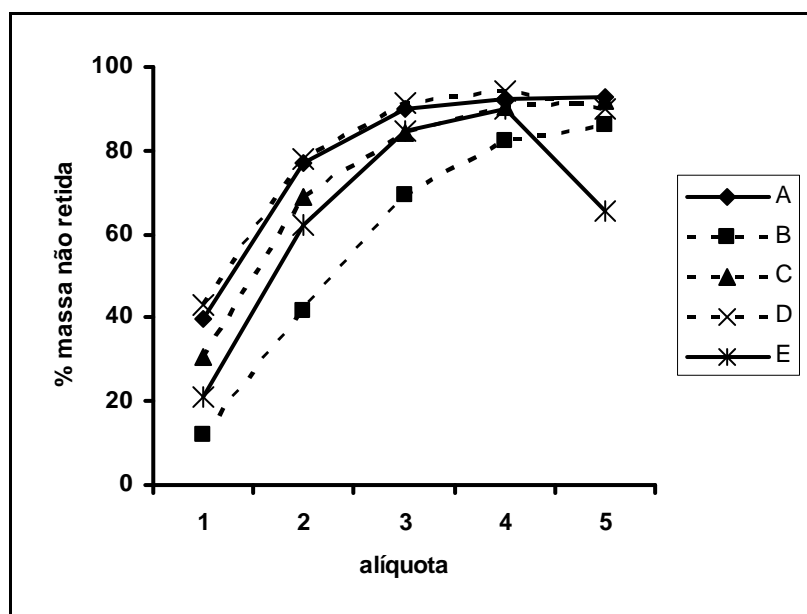


Figura 3.1. Representação da percentagem de não retenção ("breakthrough") do ácido gálico em função da alimentação de alíquotas consecutivas de  $1000 \mu\text{L}$  contendo  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

Tabela 3.4. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  de metanol, resultantes da alimentação de uma solução de 20  $\text{mg L}^{-1}$ .

ensaio	massa total retida	remoção da matriz			eluição		
		massa pré-eluída	% pré-eluição	massa remanescente no adsorvente	massa eluída	% eluição	massa não-recuperada
A	22,5	5,7	25,3	16,8	10,6	63,1	6,2
B	45,0	12,1	26,9	32,9	19,6	59,6	13,3
C	27,5	8,0	29,1	19,5	11,0	56,4	8,5
D	21,5	3,8	17,7	17,7	11,4	64,4	6,3
E	38,2	7,0	18,3	31,2	13,7	43,9	17,5

A partir dos resultados apresentados na tabela 3.3 e na figura 3.1, é possível verificar a existência da não-retenção de parte ou da quase totalidade (percentagem de “breakthrough” > 90%) do ácido gálico alimentado à coluna de extração em fase sólida. Verifica-se uma percentagem de não-retenção superior a 40% a partir da alimentação da 2ª alíquota de 1000  $\mu\text{L}$ , independentemente da matriz da solução amostra, iniciando uma possível saturação da fase sólida. De qualquer forma, analisando a massa total retida (tabela A3, última coluna), foram obtidos valores mais elevados para os ensaios B e E (45,0 e 38,2  $\mu\text{g}$ ) quando comparados com os outros ensaios (22,5, 27,5 e 21,5  $\mu\text{g}$  para os ensaios A, C e D, respectivamente), indicando que a matriz HCl 10 mM poderá oferecer melhores condições para a retenção do analito.

É importante salientar que a massa não-retida na alíquota 5 do ensaio E (tabela 3.3) poderá estar afectada de algum erro na quantificação, dado ser improvável que ocorra uma diminuição da massa não-retida com o aumento do volume de amostra alimentado à coluna de extração em fase sólida. Desta forma os resultados obtidos para este ensaio devem ser interpretados com cautela.

Também foi observada a ocorrência de pré-eluição na etapa de lavagem da coluna com solução transportadora para a remoção da matriz da amostra. Foram obtidas percentagens de pré-eluição entre 17,7 e 29,1% (tabela 3.4), não sendo possível atribuir uma tendência de acordo com a solução transportadora utilizada. Quanto à etapa de eluição, foram obtidas percentagens de eluição semelhantes, entre 56,4 e 64,4%

(exceptuando ensaio E, pelas razões indicadas anteriormente), dado que foi utilizado o mesmo eluente (metanol 100%) em todos os ensaios.

Tendo em conta a possível saturação do adsorvente usado por utilização de uma solução demasiado concentrada de ácido gálgico, a experiência anterior foi repetida utilizando soluções padrão de ácido gálgico a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (tabela 3.1). Conforme indicado anteriormente, as concentrações das soluções padrão usadas como “amostra” foram obtidas a partir da análise directa dos padrões utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu modificada implementada no leitor de microplacas, tendo sido obtidos os valores de  $4,93 \text{ mg L}^{-1}$  (solução tampão de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaCH}_3\text{COO}$  10 mM a pH 4,5),  $5,04 \text{ mg L}^{-1}$  (HCl 10 mM) e  $5,10 \text{ mg L}^{-1}$  (água). Os valores obtidos para a concentração de ácido gálgico em cada alíquota obtida estão indicados na tabela 3.5. A partir destes valores foi calculada a massa não-retida por cada  $1000 \mu\text{L}$  de amostra alimentada à coluna (tabela 3.6), a massa pré-eluída durante o passo de remoção da matriz da amostra (tabela 3.7) e a massa eluída por passagem do eluente (tabela 3.7), neste caso realizada em dois passos consecutivos. As percentagens correspondentes foram calculadas através do balanço mássico, conforme indicado anteriormente.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3.6 e na Figura 3.2, verificou-se uma melhor retenção do ácido gálgico preparado em HCl 10 mM, com ausência de “breakthrough” nas duas primeiras alíquotas. Quando o transportador usado foi água, obteve-se uma percentagem de “breakthrough”  $< 2\%$ , detectada apenas na última alíquota. No caso da solução preparada em tampão ácido acético/acetato de sódio, não ocorreu “breakthrough” apenas na 1ª alíquota de amostra, tendo se verificado um aumento sucessivo da massa não-retida nas alíquotas consecutivas. Para a solução preparada em água, foi obtida uma percentagem de massa não-retida de 46,5% logo na primeira alíquota, sendo este valor acrescido nas alíquotas subsequentes. Estes resultados estão de acordo com a natureza química do adsorvente utilizado e do composto modelo escolhido. Sabendo que as interacções que ocorrem com a fase sólida são maioritariamente hidrofóbicas, e que o pKa do grupo carboxilo na molécula de ácido gálgico é 4,24 [41], esta molécula encontra-se totalmente sob a forma protonada na solução de HCl 10 mM, parcialmente ionizada na solução tampão a pH 4,5 e totalmente ionizada quando preparada em água, justificando um rendimento superior na retenção observada para as soluções que apresentam maior quantidade de moléculas sob a forma protonada. Não foi observada uma influência clara do transportador nesta fase do ciclo de extracção dado que, ao comparar os ensaios B com E e A com D, não é identificada uma tendência de melhoria com qualquer um dos transportadores testados.

Tabela 3.5. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios A-E referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	Ensaio				
			A	B	C	D	E
1	amostra alimentada (1)	1000	< LD	< LD	$2,37 \pm 0,13$	< LD	< LD
2	amostra alimentada (2)	1000	$1,44 \pm 0,15$	< LD	$3,23 \pm 0,11$	$0,52 \pm 0,13$	< LD
3	amostra alimentada (3)	1000	$3,15 \pm 0,17$	< LD	$3,58 \pm 0,10$	$2,37 \pm 0,18$	$0,31 \pm 0,06$
4	amostra alimentada (4)	1000	$4,27 \pm 0,15$	< LD	$4,17 \pm 0,17$	$3,90 \pm 0,10$	$1,40 \pm 0,13$
5	amostra alimentada (5)	1000	$4,38 \pm 0,18$	$0,08 \pm 0,06$	$4,38 \pm 0,09$	$4,37 \pm 0,21$	$2,73 \pm 0,13$
6	transportador usado na remoção da matriz	500	$3,10 \pm 0,07$	$2,81 \pm 0,04$	$2,62 \pm 0,11$	$1,77 \pm 0,06$	$3,63 \pm 0,17$
7	eluente (1)	300	$25,0 \pm 0,3$	$61,8 \pm 0,4$	$16,4 \pm 0,6$	$37,9 \pm 0,5$	$53,4 \pm 0,4$
8	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD



Tabela 3.6. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de  $1000 \mu\text{L}$  de uma solução de ácido gálico  $5 \text{ mg L}^{-1}$ . Também são apresentados os valores correspondentes à massa total não-retida, à massa total retida após a passagem das 5 alíquotas de padrão e a percentagem de ácido gálico não-retido por alíquota (valores entre parentêses).

ensaio	massa alimentada à coluna por alíquota	massa não-retida					massa total não-retida	massa total retida
		alíquota 1	alíquota 2	alíquota 3	alíquota 4	alíquota 5		
A	4,93	< LD	1,44 (29,2%)	3,15 (63,9%)	4,27 (86,6%)	4,38 (88,8%)	13,24	11,41
B	5,04	< LD	< LD	< LD	< LD	0,08 (1,6%)	0,08	25,12
C	5,10	2,37 (46,5%)	3,23 (63,3%)	3,58 (70,2%)	4,17 (81,8%)	4,38 (85,9%)	17,73	7,77
D	4,93	< LD	0,52 (10,5%)	2,37 (48,1%)	3,90 (79,1%)	4,37 (88,6%)	11,16	13,49
E	5,04	< LD	< LD	0,31 (6,2%)	1,40 (27,8%)	2,73 (54,2%)	4,44	20,76

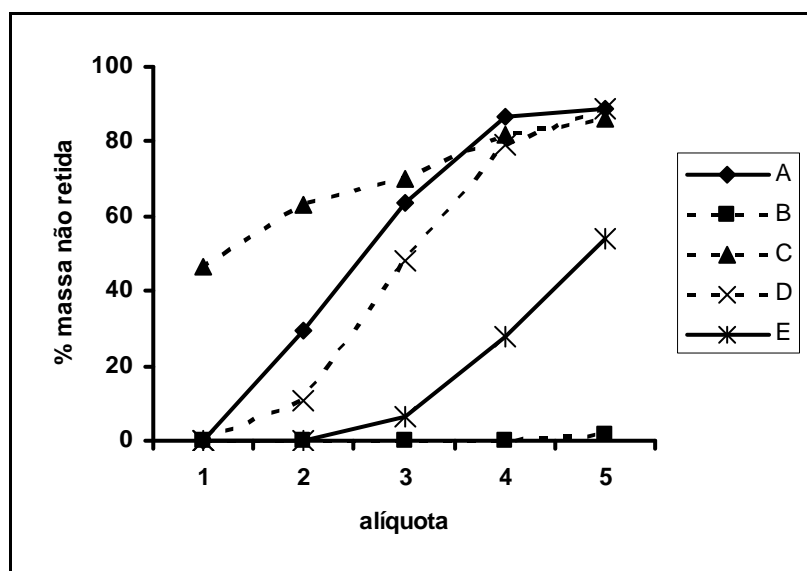


Figura 3.2. Representação da percentagem de não retenção ("breakthrough") do ácido gálico em função da alimentação de alíquotas consecutivas de  $1000 \mu\text{L}$  contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

Tabela 3.7. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  de metanol, resultantes da alimentação de uma solução de 5  $\text{mg L}^{-1}$ .

ensaio	massa total retida	remoção da matriz			eluição		
		massa pré-eluída	% pré-eluição	massa remanescente no adsorvente	massa eluída	% eluição	massa não-recuperada
A	11,41	1,55	13,6	9,86	7,50	76,1	2,36
B	25,12	1,41	5,6	23,71	18,54	78,2	5,17
C	7,77	1,31	16,9	6,46	4,92	76,2	1,54
D	13,49	0,89	6,6	12,60	11,37	90,2	1,23
E	20,76	1,82	8,8	18,94	16,02	84,6	2,92

Não há efeito visível (tendência) do transportador na pré-eluição (massas entre 0,89 e 1,82  $\mu\text{g}$ , correspondendo a percentagens entre 5 e 17%). Em termos de eluição, verificou-se ainda que não foi detectado ácido gálico na 2ª alíquota eluída, em todos os ensaios (tabela 3.5). Por outro lado, observou-se uma percentagem de eluição superior nos ensaios D e E (cerca de 90%) relativamente aos ensaios A, B e C (percentagem de eluição próxima de 78%, tabela 3.7).

As experiências seguintes tiveram como objectivo repetir os ensaios B e E de forma a estimar a repetibilidade e a reprodutibilidade dos mesmos, dado que estes apresentaram resultados mais satisfatórios em termos de massa de analito retida.

Numa primeira repetição dos ensaios, a concentração da solução padrão usada como “amostra” foi obtida a partir da análise directa do padrão utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu modificada implementada no leitor de microplacas, tendo-se obtido o valor de 5,03  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores obtidos para a concentração de ácido gálico em cada alíquota obtida estão indicados na tabela 3.8. A partir destes valores foi calculada a massa não-retida por cada 1000  $\mu\text{L}$  de amostra alimentada à coluna (tabela 3.9), a massa pré-eluída durante o passo de remoção da matriz da amostra (tabela 3.10) e a massa eluída por passagem do eluente (tabela 3.10), realizada apenas num passo. As percentagens correspondentes foram calculadas através do balanço mássico, conforme indicado anteriormente.

Tabela 3.8. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B e E referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	Ensaio	
			B	E
1	amostra alimentada (1)	1000	< LD	< LD
2	amostra alimentada (2)	1000	< LD	< LD
3	amostra alimentada (3)	1000	< LD	< LD
4	amostra alimentada (4)	1000	< LD	$0,49 \pm 0,18$
5	amostra alimentada (5)	1000	$0,85 \pm 0,07$	$1,21 \pm 0,09$
6	transportador usado na remoção da matriz	500	$4,66 \pm 0,10$	$2,27 \pm 0,11$
7	eluente (1)	300	$65,3 \pm 0,7$	$74,1 \pm 1,7$

Tabela 3.9. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de  $1000 \mu\text{L}$  de uma solução de ácido gálico  $5 \text{ mg L}^{-1}$  para os ensaios B e E. Também são apresentados os valores correspondentes à massa total não-retida, à massa total retida após a passagem das 5 alíquotas de padrão e a percentagem de ácido gálico não-retido por alíquota (valores entre parentêses).

ensaio	massa alimentada à coluna por alíquota	massa não-retida					massa total não-retida	massa total retida
		alíquota 1	alíquota 2	alíquota 3	alíquota 4	alíquota 5		
B	5,03	< LD	< LD	< LD	< LD	$0,85$ (16,9%)	1,02	24,30
E	5,03	< LD	< LD	< LD	$0,49$ (9,7%)	$1,21$ (24,1%)	1,79	23,45

Tabela 3.10. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  de metanol, resultantes da alimentação de uma solução de 5  $\text{mg L}^{-1}$  nos ensaios B e E.

ensaio	massa total retida	remoção da matriz			eluição		
		massa pré-eluída	% pré-eluição	massa remanescente no adsorvente	massa eluída	% eluição	massa não-recuperada
B	24,30	2,33	9,6	21,97	19,59	89,2	2,21
E	23,45	1,14	4,9	22,31	22,22	99,6	0,08

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3.8, verificou-se uma melhor retenção do ácido gálico quando o transportador foi água, com ausência de “breakthrough” nas quatro primeiras alíquotas. A percentagem de massa não-retida foi detectada apenas na última alíquota e foi inferior a 17%. Quando o transportador usado foi HCl 10 mM, foi detectada massa não-retida nas duas últimas alíquotas, sendo inferior a 10% na penúltima e inferior a 25% na última. Isto comprova que o transportador poderá ter alguma influência nos resultados. Por outro lado, a percentagem pré-eluída na operação de remoção da matriz da amostra, disposta na tabela 3.10, foi mais alta para o ensaio B que corresponde ao transportador água, relativamente ao ensaio E (transportador HCl 10 mM). Também se verificou que o resultado da percentagem eluída foi mais baixo para o ensaio B (transportador água).

A segunda repetição dos ensaios B e E foi realizada em triplicado, visando a avaliação da repetibilidade dos mesmos. A concentração da solução padrão usada como “amostra” foi obtida a partir da análise directa do padrão utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu modificada implementada no leitor de microplacas, tendo-se obtido o valor de 5,39  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores obtidos para a concentração de ácido gálico em cada alíquota obtida estão indicados na tabela 3.11. A partir destes valores foi calculada a massa não-retida por cada 1000  $\mu\text{L}$  de amostra alimentada à coluna (tabela 3.12), a massa pré-eluída durante o passo de remoção da matriz da amostra (tabela 3.13) e a massa eluída por passagem do eluente (tabela 3.13), realizada apenas num passo. As percentagens correspondentes foram calculadas através do balanço mássico, conforme indicado anteriormente.

Tabela 3.11. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B e E, realizados em triplicado, referentes ao estudo da pré-eluição observada para uma solução padrão contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

Ensaio						
alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	B (1)	B (2)	B (3)	E (1) E (2) E (3)
1	amostra alimentada (1)	1000	< LD	< LD	< LD	< LD < LD < LD
2	amostra alimentada (2)	1000	< LD	< LD	< LD	< LD < LD < LD
3	amostra alimentada (3)	1000	< LD	< LD	< LD	< LQ < LQ < LD
4	amostra alimentada (4)	1000	< LD	< LD	< LD	0,93 $\pm$ 0,11 1,01 $\pm$ 0,25 < LD
5	amostra alimentada (5)	1000	< LD	< LD	< LD	2,21 $\pm$ 0,15 2,17 $\pm$ 0,23 0,76 $\pm$ 0,19
6	transportado r usado na remoção da matriz	500	3,60 $\pm$ 0,13	2,92 $\pm$ 0,12	4,34 $\pm$ 0,08	3,26 $\pm$ 0,14 3,41 $\pm$ 0,21 1,82 $\pm$ 0,04
7	eluyente	300	60,6 $\pm$ 0,8	77,1 $\pm$ 2,8	63,7 $\pm$ 1,2	58,2 $\pm$ 1,7 54,3 $\pm$ 3,1 74,6 $\pm$ 0,9

Tabela 3.12. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) que não foi retido durante a alimentação da coluna de adsorvente com 5 alíquotas sucessivas de  $1000 \mu\text{L}$  de uma solução de ácido gálico  $5 \text{ mg L}^{-1}$  para os ensaios B e E, realizados em triplicado. Também são apresentados os valores correspondentes à massa total não-retida, à massa total retida após a passagem das 5 alíquotas de padrão e a percentagem de ácido gálico não-retido por alíquota (valores entre parentêses).

ensaio	massa alimentada à coluna por alíquota	massa não-retida		massa total não-retida	massa total retida
		alíquota 4	alíquota 5		
B (1)	5,39	< LD	< LD	n.d.	26,95
B (2)	5,39	< LD	< LD	n.d.	26,95
B (3)	5,39	< LD	< LD	n.d.	26,95
E (1)	5,39	0,93 (17,3%)	2,21 (41,0%)	3,14	23,81
E (2)	5,39	1,01 (18,7%)	2,17 (40,3%)	3,18	23,77
E (3)	5,39	< LD	0,76 (14,1%)	0,76	26,19

Tabela 3.13. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) pré-eluída durante a operação de remoção da matriz da amostra e para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com uma alíquota de  $300 \mu\text{L}$  de metanol, resultantes da alimentação de uma solução  $5 \text{ mg L}^{-1}$  nos ensaios B e E, realizados em triplicado.

ensaio	massa total retida	remoção da matriz			eluição		
		massa pré-eluída	% pré-eluição	massa remanescente no adsorvente	massa eluída	% eluição	massa não-recuperada
B (1)	26,95	1,80	6,7	25,15	18,18	72,3	6,97
B (2)	26,95	1,46	5,4	25,49	23,13	90,7	2,36
B (3)	26,95	2,17	8,1	24,78	19,11	77,1	5,67
E (1)	23,81	1,63	6,8	22,18	17,46	78,7	4,72
E (2)	23,77	1,71	7,2	22,07	16,29	73,8	5,78
E (3)	26,19	0,91	3,5	25,28	22,38	88,5	2,90

Os resultados apresentados na Tabela D1 e na Figura D1 demonstram que houve uma melhor retenção do ácido gálico quando o transportador foi água (ensaio B), com

ausência de “breakthrough” nas cinco primeiras alíquotas. Quando o transportador usado foi HCl 10 mM, obteve-se uma percentagem de “breakthrough” < 2%, detectada na quarta alíquota. Na última alíquota os valores de percentagem de “breakthrough” foram inferiores a 3 %. Não foi possível detectar ou quantificar a massa não-retida para o ensaio com o transportador água (ensaio B). Quando o transportador usado foi HCl 10 mM, foi detectada massa não-retida nas duas últimas alíquotas. Por outro lado, a percentagem pré-eluída média na operação de remoção da matriz da amostra, disposta na tabela D3, foi ligeiramente mais alta para o ensaio B (6,7%) que corresponde ao transportador água, relativamente ao ensaio E (5,8%) (transportador HCl 10 mM). Também se verificou que os resultados da percentagem eluída em média foram muito próximos para os dois ensaios B e E (ensaio B foi de 80,0% e ensaio E foi de 80,3%), proporcionando valores de DPR na ordem dos 10% ( $n = 3$ ), adequados a procedimentos de extracção em fase sólida. Relativamente à massa não-recuperada, no ensaio B obteve-se um valor médio de 5,00 µg e no ensaio E obteve-se um valor médio ligeiramente mais baixo (4,47 µg). Considerando os resultados obtidos para os ensaios B e E realizados em dias diferentes, recorrendo a soluções diferentes, obtiveram-se valores de DPR de 7,1% para o ensaio B e 11,5% para o ensaio E. Visto que, em termos de percentagem pré-eluída, percentagem eluída e massa não-recuperada, não se observaram diferenças significativas e que os valores de “breakthrough”, de massa não-retida durante a alimentação da amostra à coluna de adsorvente e reprodutibilidade foram melhores para o ensaio B (transportador água), fixou-se a água como transportador a utilizar nas experiências seguintes.

### 3.2.2. Estudo da composição do eluente

Foi avaliado o efeito da composição do eluente na eficiência da eluição do composto fenólico modelo. Para tal, utilizou-se o padrão de ácido gálico a uma concentração de 5 ppm, diluído em ácido clorídrico 10 mM. Os eluentes em estudo foram 100 % metanol (ensaio B), metanol 50% (v/v) + hidróxido de amónio 5% (v/v) (ensaio G) e 50 % metanol (ensaio H) e o transportador foi água. Os ensaios foram realizados em duplicado. O ciclo de carregamento da amostra foi realizado apenas uma vez, de onde se recolheu a alíquota 1 e de seguida procedeu-se à remoção da matriz (alíquota 2). O ciclo de eluição realizou-se duas vezes e recolheram-se as alíquotas 3 e 4.

A concentração da solução padrão usada como “amostra” foi obtida a partir da análise directa do padrão utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu modificada implementada

no leitor de microplacas, tendo-se obtido o valor de 5,51 mg L<sup>-1</sup>. Os valores obtidos para a concentração de ácido gálico em cada alíquota obtida estão indicados na tabela 3.14. A partir destes valores foi calculada a massa total retida durante o passo de remoção da matriz da amostra (tabela 3.15) e a massa eluída por passagem do eluente (tabela 3.15), realizada em dois passos. As percentagens correspondentes foram calculadas através do balanço mássico, conforme indicado anteriormente.

Primeiramente pode-se dizer que não foi possível detectar ou quantificar a massa não-retida em qualquer um dos ensaios. Também se verificou que os resultados de percentagem eluída na alíquota 3 (primeira eluição) foram mais elevados para o ensaio H [eluente metanol 50 % (v/v)], seguido do ensaio B (metanol) e em último o ensaio G [metanol 50% (v/v) + NH<sub>4</sub>OH 5% (v/v)] metanol. Na segunda eluição, apenas foi detectado ácido gálico no ensaio H que corresponderam a percentagens de eluição inferiores a 15%. Relativamente à massa não-recuperada, no ensaio B obtiveram-se valores inferiores a 1,5 µg, no ensaio G valores inferiores a 3 µg e no ensaio H não foi detectada qualquer quantidade. Em termos de percentagem de eluição, os resultados obtidos mais próximos de 100% foram os referentes ao ensaio com eluente eluente metanol 50% (v/v). Na realidade, os valores obtidos ultrapassam 100%, provavelmente devido a erros na quantificação da massa eluída na 2ª porção de eluente. Foram obtidas percentagens de eluição na ordem dos 75% para o ensaio com metanol 100% e na ordem dos 55% para o eluente contendo metanol 50% (v/v) + hidróxido de amónio 5% (v/v). Dada a interacção de natureza hidrofóbica entre o ácido gálico e o adsorvente OASIS<sup>TM</sup> HLB, era esperado que fossem obtidos melhores resultados no ensaio G, onde há alteração do pH para valores alcalinos durante a eluição, causando a ionização do ácido gálico. Esta alteração de carga da molécula deveria favorecer a sua dessorção e consequente eluição. Dado que tal não ocorreu, foi colocada a hipótese de ocorrer degradação do composto fenólico durante o tempo que decorre entre a recolha do eluato e a quantificação pelo método Folin-Ciocalteu, degradação esta acelerada em meio alcalino. Para investigar esta possibilidade, a experiência anterior foi repetida, com acidificação imediata de uma das alíquotas recolhidas.



Tabela 3.14. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B, G e H, realizados em duplicado, referentes ao estudo da composição do eluente aplicado a uma solução padrão contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico.

Ensaio								
alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	B (1)	B (2)	G (1)	G (2)	H (1)	H (2)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
2	transportad or usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$13,4 \pm 0,4$	$14,4 \pm 0,4$	$9,93 \pm 0,24$	$10,3 \pm 0,2$	$17,4 \pm 0,5$	$17,8 \pm 0,5$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD	< LD	$2,42 \pm 0,36$	$2,66 \pm 0,31$

Tabela 3.15. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com duas alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  de metanol (ensaio B), metanol 50% (v/v) +  $\text{NH}_4\text{OH}$  5% (v/v) (ensaio G) e metanol 50% (v/v) (ensaio H).

ensaio	massa total retida	massa eluída (1)	% eluição (1)	massa eluída (2)	% eluição (2)	massa não-recuperada
B (1)	5,51	4,02	73,0	n.d.	n.a.	1,49
B (2)	5,51	4,32	78,4	n.d.	n.a.	1,19
G (1)	5,51	2,98	54,1	n.d.	n.a.	2,53
G (2)	5,51	3,09	56,1	n.d.	n.a.	2,42
H (1)	5,51	5,22	94,7	0,73	13,2	n.a.
H (2)	5,51	5,34	96,9	0,80	14,5	n.a.

n.d., não detectado; n.a., não aplicável

Desta forma, além dos ensaios B, G e H descritos anteriormente, realizaram-se ainda os ensaios B (acid.) (eluente metanol), em que pipetaram-se 200  $\mu\text{L}$  das alíquotas 3 e 4 e adicionaram-se 200  $\mu\text{L}$  de água e 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl}$  0,6 M, além dos ensaios G (acid.) [eluente metanol 50% (v/v) + hidróxido de amónio 5% (v/v)] e H (acid.), em que pipetaram-se 200  $\mu\text{L}$  das alíquotas 3 e 4 e adicionaram-se 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl}$  0,6 M. O ciclo de carregamento da amostra foi realizado apenas uma vez, de onde se recolheu a alíquota 1 e de seguida procedeu-se à remoção da matriz (alíquota 2). O ciclo de eluição realizou-se duas vezes e recolheram-se as alíquotas 3 e 4.

A concentração da solução padrão usada como “amostra” foi obtida a partir da análise directa do padrão utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu modificada implementada no leitor de microplacas, tendo-se obtido o valor de 5,28  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores obtidos para a concentração de ácido gálico em cada alíquota obtida estão indicados na tabela 3.16. A partir destes valores foi calculada a massa total retida durante o passo de remoção da matriz da amostra (tabela 3.17) e a massa eluída por passagem do eluente (tabela 3.17), realizada em dois passos. As percentagens correspondentes foram calculadas através do balanço mássico, conforme indicado anteriormente.

Tabela 3.16. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B, G e H, realizados em duplicado, referentes ao estudo da composição do eluente aplicado a uma solução padrão contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico. A um dos ensaios ("acid.") foi adicionado HCl imediatamente após a eluição da coluna extractora.

Ensaio								
alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	B	B (acid.)	G	G (acid.)	H	H (acid.)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	$2,46 \pm 0,30$	$0,85 \pm 0,09$	$1,38 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,07$
3	eluente (1)	300	$13,8 \pm 0,6$	$6,35 \pm 0,52$	$4,09 \pm 0,42$	$11,2 \pm 0,6$	$4,32 \pm 0,59$	$7,53 \pm 0,09$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.17. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com a primeira alíquota de 300  $\mu\text{L}$  de metanol (ensaio B), metanol 50% (v/v) +  $\text{NH}_4\text{OH}$  5%(v/v) (ensaio G) e metanol 50% (v/v) (ensaio H), incluindo ou não ácido logo a seguir à eluição.

ensaio	massa total retida	remoção da matriz			eluição		
		massa pré-eluída	% pré-eluição	massa remanescente no adsorvente	massa eluída	% eluição	massa não-recuperada
B	5,28	n.d.	n.a.	5,28	4,14	78,4	1,14
B (acid.)	5,28	n.d.	n.a.	5,28	1,91	36,1	3,38
G	5,28	1,23	23,3	4,05	1,23	30,3	2,82
G (acid.)	5,28	0,43	8,0	4,86	3,36	69,2	1,50
H	5,28	0,69	13,1	4,59	1,30	28,2	3,29
H (acid.)	5,28	0,26	4,9	5,02	2,26	45,0	2,76

Antes de mais, os valores obtidos de massa eluída e percentagem de eluição para a quarta alíquota (segunda etapa de eluição) não foram incluídos na tabela 3.17 pois os valores de concentração de ácido gálico foram inferiores ao limite de detecção (tabela 3.16).

Nos ensaios G, G (acid.), H e H (acid.) foram detectadas quantidades de analito na alíquota 2, na etapa de remoção da amostra com transportador. Sendo assim, a percentagem de pré-eluição no caso do ensaio G foi cerca de 24% e no caso G (acid.) foi de 8%. No ensaio H, obteve-se uma percentagem de pré-eluição inferior a 14% enquanto que no ensaio H (acid.) este valor foi inferior a 5%. Pode-se dizer que a acidificação imediata da alíquota influencia positivamente a capacidade de detectar e quantificar o analito quando ocorre pré-eluição e o mesmo foi verificado para a percentagem de eluição, claramente superior nos ensaios G (acid.) e H (acid.) relativamente aos ensaios correspondentes G e H. Isto pode ser traduzido como uma degradação do composto modelo quer em meio alcalino e quer em meio aquoso sem ajuste do pH. Relativamente aos ensaios B e B (acid.) não ocorreu pré-eluição do analito e a percentagem de eluição foi bastante diferente nas duas situações, o que efectivamente não faz sentido, dado que o ácido gálico deveria estar sempre na forma protonada em ambas as situações.

Desta incoerência surge a hipótese de haver um artefacto no método de Folin-Ciocalteu modificado, em que a acidificação das amostras por adição de  $\text{HCl}$  0,6 M causou uma alteração da cinética da reacção, pois o excesso de ácido poderá consumir

significativamente o hidróxido de sódio do meio reaccional, que tinha como função acelerar a reacção e torná-la mais expedita. Assim, optou-se por repetir estes ensaios utilizando o método de determinação da capacidade antioxidante Folin-Ciocalteu clássico, para quantificação do ácido gálgico nas alíquotas recolhidas.

O valor obtido para a concentração da solução padrão usada como “amostra” foi de 5,19 mg L<sup>-1</sup>. Os valores obtidos para a concentração de ácido gálgico em cada alíquota obtida estão indicados na tabela 3.18. A partir destes valores foi calculada a massa total retida durante o passo de remoção da matriz da amostra (tabela 3.19) e a massa eluída por passagem do eluente (tabela 3.19), realizada em dois passos. As percentagens correspondentes foram calculadas através do balanço mássico, referido anteriormente.

Tal como na experiência anterior, os valores obtidos de massa eluída e percentagem de eluição para a quarta alíquota (segunda etapa de eluição) não foram incluídos na tabela 3.19, dado que os valores de concentração de ácido gálgico foram inferiores ao limite de detecção (tabela 3.18).

Relativamente aos ensaios B e B (acid.) observou-se pré-eluição do analito apenas no segundo caso, sendo o valor de percentagem de pré-eluição inferior a 3%. Nos restantes ensaios a percentagem de pré-eluição foi mais alta no ensaio G (acid.) em relação ao G e mais baixa no ensaio H (acid.) em relação ao ensaio H.

A percentagem de eluição foi bastante semelhante nos ensaios B e B (acid.), o que corrobora a suposição da existência de um erro na quantificação ocasionado pelo método de Folin-Ciocalteu modificado. A percentagem de eluição mais elevada foi obtida para os ensaios G (acid.) e H (acid.) o que comprova mais uma vez a importância da acidificação imediata de forma a evitar a degradação do composto modelo em meios alcalino e aquoso sem controlo de pH.

No sentido de escolher o eluente comprovadamente mais eficiente, repetiram-se os ensaios G (acid.) e H (acid.), cada um realizado em quintuplicado. Os valores médios de percentagem de eluição obtidos foram 97,5% (DPR = 4,3%) e 89,5% (DPR = 10,9%) para os ensaios G (acid.) e H (acid.), respectivamente. Desta forma o solvente escolhido foi a solução contendo metanol 50% (v/v) + hidróxido de amónio 5% (v/v) pois esta originou maior recuperação com menor desvio padrão, sendo a partir de agora sempre realizada a acidificação da alíquota logo a seguir à recolha da mesma.

Tabela 3.18. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios B, G e H, realizados em duplicado, referentes ao estudo da composição do eluente aplicado a uma solução padrão contendo  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido gálico. A um dos ensaios ("acid.") foi adicionado HCl imediatamente após a eluição da coluna extractora.

Ensaio								
alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	B	B (acid.)	G	G (acid.)	H	H (acid.)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	$0,27 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,06$	$0,91 \pm 0,16$	$0,38 \pm 0,14$
3	eluente (1)	300	$13,3 \pm 0,5$	$13,0 \pm 0,4$	$6,59 \pm 0,00$	$15,9 \pm 0,3$	$7,52 \pm 0,20$	$15,9 \pm 0,5$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.19. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com a primeira alíquota de 300  $\mu\text{L}$  de metanol (ensaio B), metanol 50% (v/v) +  $\text{NH}_4\text{OH}$  5%(v/v) (ensaio G) e metanol 50% (v/v) (ensaio H), incluindo ou não ácido logo a seguir à eluição.

ensaio	massa total retida	remoção da matriz			eluição		
		massa pré-eluída	% pré-eluição	massa remanescente no adsorvente	massa eluída	% eluição	massa não-recuperada
B	5,19	n.d.	n.a.	5,19	3,99	76,9	1,20
B (acid.)	5,19	0,14	2,6	5,06	3,90	77,2	1,16
G	5,19	0,10	1,9	5,09	1,98	38,8	3,11
G (acid.)	5,19	0,44	8,5	4,75	4,77	100,4	0,00
H	5,19	0,46	8,8	4,74	2,26	47,6	2,48
H (acid.)	5,19	0,19	3,7	5,00	4,77	95,4	0,23

### 3.3. Aplicação do procedimento de extracção automática

#### 3.3.1. Aplicação a compostos puros

O próximo passo consistiu no estudo do comportamento dos parâmetros seleccionados (transportador, solvente e eluente) a várias concentrações do padrão de ácido gálico (1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ppm), em duplicado. No decorrer dos ensaios, verificou-se que a presença do hidróxido de amónio causava precipitação nos poços da micro-placa ao ser adicionado o reagente de Folin-Ciocalteu (FCR) no tampão carbonato de sódio. Por esta razão se alterou o eluente para metanol 50% (v/v) + hidróxido de sódio 10 mM e testou-se este eluente nas diferentes concentrações supracitadas.

Na tabela 3.20 está representado um resumo dos resultados obtidos na análise em duplicado de padrões de ácido gálico nas concentrações 2,5 (A); 5,0 (B); 7,5 (C) e 10,0 (D)  $\text{mg L}^{-1}$  e respectivo desvio-padrão em  $\text{mg L}^{-1}$ .

Tabela 3.20. Valores de concentração de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas para o processamento das soluções padrão A-D, realizados em duplicado. A cada um dos ensaios foi adicionado HCl imediatamente após a eluição da coluna extractora.

Ensaio									
alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	A (1)	A (2)	B (1)	B (2)	C (1)	C (2)	D (1) D (2)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$7,31 \pm 0,12$	$7,41 \pm 0,42$	$15,1 \pm 0,2$	$16,4 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$21,3 \pm 0,1$	$29,2 \pm 0,2$ $31,3 \pm 0,5$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD



Tabela 3.21. Valores calculados para a massa de ácido gálico ( $\mu\text{g}$ ) eluída com a primeira alíquota de 300  $\mu\text{L}$  de eluente para soluções padrão com diferentes concentrações de ácido gálico.

ensaio	massa total retida	eluição		
		massa eluída	% eluição	massa não-recuperada
A (1)	2,18	2,19	100,7	0,00
A (2)	2,18	2,22	102,1	0,00
B (1)	5,20	4,53	87,1	0,67
B (2)	5,20	4,92	94,6	0,28
C (1)	7,02	6,94	96,9	0,22
C (2)	7,02	6,38	89,9	0,72
D (1)	9,64	8,75	88,8	1,10
D (2)	9,64	9,38	95,5	0,44

Para a concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  não se conseguiu quantificar o ácido gálico nas alíquotas 3 e 4, correspondentes ao eluato. Nas concentrações seguintes, os resultados foram melhores, em que a percentagem de eluição na 1ª alíquota variou entre 88,8 e 100,7%, valores aceitáveis para procedimentos de extracção em fase sólida. Sendo assim, a substituição do hidróxido de amónio por hidróxido de sódio não alterou a performance do método, permitindo alcançar resultados satisfatórios para concentrações superiores a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ , inclusive.

Seguidamente, outros compostos fenólicos (ácido cafeico, galhato de octilo, quercetina e ácido tânico) e não-fenólicos (ácido ascórbico) foram processados através do sistema (concentrações  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , aproximadamente). Neste caso, a concentração obtida em cada alíquota (tabelas 3.22 a 3.26) foi aferida através de curvas de calibração estabelecidas para cada um dos compostos em estudo por análise directa de soluções padrão entre  $2,5$  e  $25 \text{ mg L}^{-1}$  através do método de Folin-Ciocalteu convencional.

As concentrações obtidas a partir da leitura directa da amostra no leitor de micro-placas foram  $5,56$  (ácido cafeico),  $4,39$  (galhato de octilo),  $5,15$  (quercetina),  $4,80$  (ácido tânico) e  $5,02$  (ácido ascórbico)  $\text{mg L}^{-1}$ . Os valores obtidos para a massa obtida em cada etapa do procedimento de extracção estão resumidos na tabela 3.27.

Tabela 3.22. Valores de concentração de ácido cafeico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$16,2 \pm 0,3$	$17,5 \pm 0,3$	$17,2 \pm 0,3$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.23. Valores de concentração de galhato de octilo ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$1,12 \pm 0,38$	$1,01 \pm 0,24$	$1,33 \pm 0,81$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.24. Valores de concentração de quercetina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$10,7 \pm 0,3$	$11,5 \pm 0,2$	$13,3 \pm 0,1$
4	eluente (2)	300	$0,34 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,13$	$0,31 \pm 0,08$

Tabela 3.25. Valores de concentração de ácido tânico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$10,0 \pm 0,2$	$8,42 \pm 0,00$	$9,75 \pm 0,26$
4	eluente (2)	300	$1,26 \pm 0,15$	$1,41 \pm 0,15$	$1,56 \pm 0,29$

Tabela 3.26. Valores de concentração de ácido ascórbico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes a este composto.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	$4,77 \pm 0,97$	$4,20 \pm 0,15$	$4,24 \pm 0,09$
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	< LD	< LD	< LD
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD

Os valores obtidos na tabela 3.27 demonstram que o ácido cafeico apresenta um comportamento semelhante ao ácido gálico, sendo completamente retido na coluna e eluído na 3ª alíquota em quantidade significativa (percentagem de eluição de cerca de 92%). Os outros compostos fenólicos apresentam comportamento semelhante no que diz respeito à retenção, não tendo sido verificado o aparecimento dos mesmos na amostra percolada (alíquota 1) ou na água usada para remoção da amostra (alíquota 2). No entanto a eficiência de recuperação foi mais baixa para os compostos com estrutura mais complexa, como é o caso da quercetina e do ácido tânico, cuja percentagem de eluição total atingiu apenas os 70%. É também importante salientar que foram detectados compostos na alíquota 4, correspondente a 2ª fracção de eluente, nos dois casos mencionados, indicando também a necessidade de uma maior quantidade de eluente para a remoção quantitativa destes compostos. No caso do galhato de octilo, a recuperação deste composto na eluição é muito baixa, em torno dos 8%, não tendo sido

detectado na 2ª fracção de eluente. Tal pode ser por não ocorrer uma remoção total deste composto da fase sólida, dada a existência de uma cadeia carbonada longa na sua estrutura, que confere uma hidrofobicidade acentuada quando comparado com os outros compostos testados. No caso do ácido ascórbico, os resultados obtidos vão de encontro ao esperado, dado que cerca de 87% deste composto é recuperado na amostra percolada e não é detectado nas outras alíquotas, o que indica a sua não-retenção no adsorvente nas condições testadas.

Tabela 3.27. Valores calculados para a massa dos compostos testados ( $\mu\text{g}$ ) nas várias etapas do procedimento de extração em fase sólida.

ensaio	massa alimentada à coluna	massa não-retida	% massa não-retida	massa remanescente no adsorvente	massa eluída (1)	massa eluída (2)	% eluição (total)	massa não-recuperada
ácido cafeico (1)	5,56	n.d.	n.a.	5,56	4,86	n.d.	87,4	0,70
ácido cafeico (2)	5,56	n.d.	n.a.	5,56	5,25	n.d.	94,4	0,31
ácido cafeico (3)	5,56	n.d.	n.a.	5,56	5,16	n.d.	92,8	0,40
galhato de octilo (1)	4,39	n.d.	n.a.	4,39	0,34	n.d.	7,7	4,05
galhato de octilo (2)	4,39	n.d.	n.a.	4,39	0,30	n.d.	6,8	4,09
galhato de octilo (3)	4,39	n.d.	n.a.	4,39	0,40	n.d.	9,1	3,99
quercetina (1)	5,15	n.d.	n.a.	5,15	3,21	0,10	64,3	1,84
quercetina (2)	5,15	n.d.	n.a.	5,15	3,45	0,11	69,1	1,59
quercetina (3)	5,15	n.d.	n.a.	5,15	3,99	0,09	79,2	1,07
ácido tânico (1)	4,80	n.d.	n.a.	4,80	3,00	0,38	70,4	1,42
ácido tânico (2)	4,80	n.d.	n.a.	4,80	2,53	0,42	61,5	1,85
ácido tânico (3)	4,80	n.d.	n.a.	4,80	2,93	0,47	70,8	1,40
ácido ascórbico (1)	5,02	4,77	95,0	0,25	n.d.	n.d.	n.a.	0,25
ácido ascórbico (2)	5,02	4,20	83,7	0,82	n.d.	n.d.	n.a.	0,82
ácido ascórbico (3)	5,02	4,24	84,5	0,78	n.d.	n.d.	n.a.	0,78

### 3.3.2. Aplicação a amostras

De forma a demonstrar a aplicabilidade do procedimento automático de extracção em fase sólida proposto foram testadas amostras de vinhos tinto (A-C) e amostras de sumos de laranja comerciais (D-F). Foram recolhidas as quatro alíquotas indicadas nos ensaios anteriores, onde foi determinada a massa equivalente em ácido gálico pelo método Folin-Ciocalteu convencional. No caso das alíquotas 1 e 2, o valor de massa equivalente em ácido gálico corresponde a todos os compostos que não ficaram retidos na coluna, ou seja, à fracção de compostos que contribui para a capacidade redutora de Folin-Ciocalteu mas que não são fenólicos. No caso das alíquotas 3 e 4, o valor de massa equivalente em ácido gálico corresponde aos compostos que foram adsorvidos à coluna, ou seja, à fracção de compostos fenólicos que contribui para a capacidade redutora de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos para a concentração equivalente obtida em cada alíquota estão indicados nas tabelas 3.28 a 3.33, enquanto que os valores de massa equivalente e percentagem mássica correspondente estão indicadas na tabela 3.34. Ao contrário do que foi efectuado para resultados anteriores, a percentagem mássica apresentada refere-se à massa total equivalente alimentada à coluna (aferida por análise directa das amostras pelo método de Folin-Ciocalteu, após diluição adequada). O factor de diluição aplicado aos vinhos foi 500 vezes e aos sumos foi 50 vezes.

Os valores obtidos para os dois tipos de amostra vão de encontro ao esperado, em que cerca de 80-85% da capacidade redutora observada pela análise directa dos vinhos é recuperada na 1ª fracção do eluato, correspondendo praticamente a compostos fenólicos. O facto deste valor não estar mais próximo de 100% pode ser devido a erros na quantificação das fracções onde não há detecção, mas que podem exibir valores não quantificáveis pelo método aplicado. Esta diferença também pode ser devida à contribuição de compostos fenólicos não passíveis de recuperação, que permaneçam retidos na coluna extractora nas condições de eluição usadas, conforme verificado para o galhato de octilo na secção anterior.

No caso dos sumos de laranja, uma parcela significativa da capacidade redutora é oriunda de compostos não-retidos, como o ácido ascórbico, o que é verificado com a obtenção de valores na ordem dos 50 a 65% de massa equivalente não-retida ou pré-eluída. A contribuição dos compostos fenólicos situa-se na ordem dos 20%, dado que também existem este tipo de compostos nos sumos de laranja. A fracção não-recuperada está na mesma ordem de grandeza que a obtida para os vinhos (entre 15 a 30%),

indiciando possíveis problemas na quantificação de baixas concentrações nas diferentes alíquotas.

Tabela 3.28. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra A.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$11,4 \pm 1,2$	$12,2 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,2$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.29. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra B.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$9,05 \pm 0,61$	$9,50 \pm 0,21$	$10,7 \pm 0,2$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.30. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra C.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	< LD	< LD	< LD
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$9,61 \pm 0,18$	$9,01 \pm 0,13$	$9,08 \pm 0,24$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.31. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra D.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	$11,3 \pm 0,2$	$11,0 \pm 0,2$	$11,3 \pm 0,3$
2	transportador usado na remoção da matriz	500	$2,79 \pm 0,07$	$3,37 \pm 0,10$	$2,87 \pm 0,03$
3	eluente (1)	300	$15,2 \pm 0,08$	$15,0 \pm 0,3$	$13,9 \pm 0,2$
4	eluente (2)	300	$1,77 \pm 0,11$	$2,11 \pm 0,08$	$3,07 \pm 0,07$

Tabela 3.32. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra E.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	$2,27 \pm 0,97$	$2,14 \pm 0,04$	$2,12 \pm 0,06$
2	transportador usado na remoção da matriz	500	$0,22 \pm 0,06$	< LD	$0,22 \pm 0,03$
3	eluente (1)	300	$2,35 \pm 0,11$	$2,17 \pm 0,08$	$2,08 \pm 0,23$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD



Tabela 3.33. Valores de concentração em equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidos para cada uma das alíquotas recolhidas nos ensaios realizados em triplicado referentes à amostra F.

alíquota	descrição	volume ( $\mu\text{L}$ )	(1)	(2)	(3)
1	amostra alimentada	1000	$2,15 \pm 0,18$	$2,02 \pm 0,04$	$2,09 \pm 0,09$
2	transportador usado na remoção da matriz	500	< LD	< LD	< LD
3	eluente (1)	300	$2,97 \pm 0,17$	$2,41 \pm 0,07$	$2,37 \pm 0,80$
4	eluente (2)	300	< LD	< LD	< LD

Tabela 3.34. Valores calculados para a massa equivalente em ácido gálico (µg) para as amostras testadas nas várias etapas do procedimento de extracção em fase sólida.

amostra	massa alimentada à coluna	massa não-retida	massa pré-eluída	massa eluída (1)	massa eluída (2)	massa não- recuperada
A (1)	4,30	n.d.	n.d.	3,42 (79,5 %)	n.d.	0,88 (20,5 %)
A (2)	4,30	n.d.	n.d.	3,66 (85,1 %)	n.d.	0,64 (14,9 %)
A (3)	4,30	n.d.	n.d.	3,54 (82,3 %)	n.d.	0,76 (17,7 %)
B (1)	3,91	n.d.	n.d.	2,71 (69,3 %)	n.d.	1,20 (30,7 %)
B (2)	3,91	n.d.	n.d.	2,85 (72,9 %)	n.d.	1,06 (27,1 %)
B (3)	3,91	n.d.	n.d.	3,22 (82,4 %)	n.d.	0,69 (17,6 %)
C (1)	3,19	n.d.	n.d.	2,88 (90,3 %)	n.d.	0,31 (9,7 %)
C (2)	3,19	n.d.	n.d.	2,70 (84,6 %)	n.d.	0,49 (15,4 %)
C (3)	3,19	n.d.	n.d.	2,73 (85,6 %)	n.d.	0,46 (14,4 %)
D (1)	19,8	11,3 (57,1 %)	1,39 (7,0 %)	4,55 (23,0 %)	0,53 (2,7 %)	2,59 (13,1 %)
D (2)	19,8	11,0 (55,6 %)	1,69 (8,5 %)	4,49 (22,7 %)	0,63 (3,2 %)	2,64 (13,3 %)
D (3)	19,8	11,3 (57,1 %)	1,44 (7,3 %)	4,18 (21,1 %)	0,92 (4,6 %)	2,97 (15,0 %)
E (1)	3,77	2,27 (60,2 %)	0,11 (2,9 %)	0,70 (18,6 %)	n.d.	0,68 (18,0 %)
E (2)	3,77	2,14 (56,8 %)	n.d.	0,65 (17,2 %)	n.d.	0,98 (26,0 %)
E (3)	3,77	2,12 (56,2 %)	0,11 (2,9 %)	0,62 (16,4 %)	n.d.	0,91 (24,1 %)
F (1)	4,07	2,15 (52,8 %)	n.d.	0,89 (21,9 %)	n.d.	1,02 (25,1 %)
F (2)	4,07	2,02 (49,6 %)	n.d.	0,72 (17,7 %)	n.d.	1,33 (32,7 %)
F (3)	4,07	2,09 (51,4 %)	n.d.	0,71 (17,4 %)	n.d.	1,27 (31,2 %)

**Conclusões**

#### 4. Conclusões

Com este trabalho de dissertação pretendeu-se implementar um sistema automático baseado em LOV-BI, onde é realizada a extracção em fase sólida de amostras alimentares, separando os compostos fenólicos presentes, seguido de quantificação através do método de Folin-Ciocalteu.

Uma vantagem clara da automatização da técnica de extracção foi a elevada frequência de processamento da amostra atingida, cerca de 8 extracções por hora, o que frequentemente não se verifica quando é realizada de forma manual com cartuchos convencionais. Observou-se também que o consumo de reagentes foi significativamente mais baixo e que houve maior precisão na manipulação de volumes pequenos resultante da manipulação das soluções realizada de forma automática. Em termos de segurança laboratorial, pode-se dizer que não há exposição directa do operador a reagentes tóxicos (sobretudo solventes) e a sua intervenção no sistema é a mínima possível. Após a selecção do transportador e eluente adequados, foi possível eliminar o “breakthrough” do composto modelo (ácido gálico) e obter recuperações na ordem dos 90% no intervalo de concentrações de 2,5 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico.

No entanto, a automatização da extracção em fase sólida acarreta alguns obstáculos na sua implementação e custos adicionais, dada a necessidade de uma montagem dedicada e software de controlo compatível. É importante referir que a configuração física do dispositivo LOV deverá ser melhorada de forma a reduzir problemas relacionados com a sobrepressão, gerada principalmente quando as soluções são enviadas para a coluna extractora, e observa-se a saída ocasional de líquido pelas portas adjacentes à coluna.

A extracção em fase sólida da amostra antes da quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu permitiu separar os compostos fenólicos dos não fenólicos, à excepção do galhato de octilo que ficou retido na coluna extractora mas não foi eluído (percentagens de eluição compreendidas entre 6,8 e 9,1%), tendo sido eliminado juntamente com o descarte da coluna. Os restantes compostos fenólicos apresentaram percentagens de eluição da ordem dos 90% para o ácido cafeico e 70% para a quercetina e ácido tânico. O ácido ascórbico (composto não fenólico) não ficou retido na coluna tendo sido eliminado aquando da remoção da matriz, pelo que apresentou uma percentagem de massa não-retida da ordem dos 90% e não foi detectada massa eluída nos dois ciclos de eluição.

Na análise a amostras alimentares (vinhos e sumos) foi possível distinguir a contribuição de compostos fenólicos e não fenólicos na capacidade antioxidante após tratamento das mesmas na coluna extractora. Verificou-se que nas três amostras de vinhos a maior parte é devida aos compostos fenólicos, dado que não foram detectados valores para massa não-retida nem para massa pré-eluída e a percentagem de eluição foi superior a 70%. No caso das amostras de sumo, obtiveram-se valores de massa não-retida superiores a 49,6% nas três amostras e de massa pré-eluída superiores a 7% numa das amostras. Não foi detectada massa eluída, excepto numa das amostras de sumo, mas estes valores não foram além dos 5%. Estes resultados nos sumos sugerem que a capacidade antioxidante é maioritariamente baseada em termos de compostos não fenólicos.

Futuramente deverá ser feito um estudo aprofundado com mais compostos fenólicos, validando a automatização da técnica de extracção em fase sólida com, por exemplo, o catecol, ácido ferrúlico, pirogalhol, entre outros, e mais compostos não fenólicos, como o sulfato ferroso. Será de todo o interesse estender a aplicação a mais amostras alimentares, cujo perfil fenólico e teor em ácido ascórbico sejam conhecidos, recorrendo a técnicas de determinação complementares, como é o caso da cromatografia líquida com detecção UV para o estabelecimento do perfil fenólico e também através de métodos enzimáticos para avaliação do teor em ácido ascórbico. A detecção/quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu não é suficientemente sensível para concentrações baixas de compostos ( $< 1 \text{ mg L}^{-1}$ ), pelo que o método também limitou a precisão dos resultados em alíquotas com baixo teor. Sugere-se desta forma a utilização de outros métodos para a quantificação dos compostos fenólicos, como por exemplo a cromatografia líquida com detecção UV.

## Referências

## 5. Referências

- [1] F.J. Krug, Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, CENA/USP, Piracicaba, 2008.
- [2] N.J.K. Simpson, Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications, New York, 2000.
- [3] T. Hyötyläinen, Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 14-28.
- [4] S. Rodriguez-Mozaz, M.J. López de Alda, D. Barceló, Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 97-115.
- [5] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analyses, Anal. Chim. Acta 78 (1975).
- [6] A. Economou, Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment, Trac-Trends Anal. Chem. 24 (2005) 416-425.
- [7] M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, Automatic flow systems based on sequential injection analysis for routine determinations in wines, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 3-9.
- [8] J. Ruzicka, G.D. Marshall, Sequential Injection - a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329-343.
- [9] J. Ruzicka, Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection, Analyst 125 (2000) 1053-1060.
- [10] C.H. Wu, L. Scampavia, J. Ruzicka, B. Zamost, Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system, Analyst 126 (2001) 291-297.

- 
- [11] C.G. Amorim, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, Exploiting sequential injection analysis with lab-on-valve and miniaturized potentiometric detection - Epinephrine determination in pharmaceutical products, *Talanta* 72 (2007) 1255-1260.
- [12] J. Ruzicka, L. Scampavia, From flow injection to bead injection, *Anal. Chem.* 71 (1999) 257A-263A.
- [13] J. Ruiz-Jiménez, M.D. Luque de Castro, Lab-on-valve for the automatic determination of the total content and individual profiles of linear alkylbenzene sulfonates in water samples, *Electrophoresis* 29 (2008) 590-596.
- [14] C.M. Schulz, J. Ruzicka, Real-time determination of glucose consumption by live cells using a lab-on-valve system with an integrated microbioreactor, *Analyst* 127 (2002) 1293-1298.
- [15] Y. Ogata, L. Scampavia, J. Ruzicka, C.R. Scott, M.H. Gelb, F. Turecek, Automated affinity capture-release of biotin-containing conjugates using a lab-on-valve apparatus coupled to UV/visible and electrospray ionization mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4702-4708.
- [16] M. Miró, S.K. Hartwell, J. Jakmunee, K. Grudpan, E.H. Hansen, Recent developments in automatic solid-phase extraction with renewable surfaces exploiting flow-based approaches, *Trac-Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 749-761.
- [17] H.M. Oliveira, Automatic methodologies for environmentally friendly processing of samples and coupling to liquid chromatography, PhD thesis, Universidade do Porto, Porto, 2010.
- [18] W. Boonjob, Y.L. Yu, M. Miró, M.A. Segundo, J.H. Wang, V. Cerdà, Online hyphenation of multimodal microsolid phase extraction involving renewable molecularly imprinted and reversed-phase sorbents to liquid chromatography for automatic multiresidue assays, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3052-3060.
- [19] J.B. Quintana, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, Automated on-line renewable solid-phase extraction-liquid chromatography exploiting multisyringe flow injection-bead injection lab-on-valve analysis, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2832-2840.
- [20] H.M. Oliveira, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, M. Miró, V. Cerdà, On-line renewable solid-phase extraction hyphenated to liquid chromatography for the determination



- of UV filters using bead injection and multisyringe-lab-on-valve approach, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3575-3582.
- [21] X.W. Chen, J. Jiao, J.H. Wang, Determination of proteins in a meso-fluidic lab-on-valve system, *Chin. J. Anal. Chem.* 36 (2008) 1601-1605.
- [22] S.S.M.P. Vidigal, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, Sequential injection-LOV format for peak height and kinetic measurement modes in the spectrophotometric enzymatic determination of ethanol: Application to different alcoholic beverages, *Talanta* 77 (2008) 494-499.
- [23] S.S.M.P. Vidigal, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, Sequential injection lab-on-Valve system for the determination of the activity of peroxidase in vegetables, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2071-2075.
- [24] H.M. Oliveira, M.A. Segundo, J.L.F.C. Lima, M. Miró, V. Cerdà, Exploiting automatic on-line renewable molecularly imprinted solid-phase extraction in lab-on-valve format as front end to liquid chromatography: application to the determination of riboflavin in foodstuffs, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 77-86.
- [25] D.J. Huang, B.X. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841-1856.
- [26] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44-84.
- [27] L.M. Magalhães, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 1-19.
- [28] L.M. Magalhães, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, A.O.S.S. Rangel, Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5241-5246.
- [29] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.* 84 (1993) 407-412.

- 
- [30] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature* 181 (1958) 1199-1200.
- [31] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.* 28 (1995) 25-30.
- [32] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70-76.
- [33] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Meth. Enzymol.* 299 (1999) 15-27.
- [34] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Meth. Enzymol.* 299 (1999) 152-178.
- [35] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Amer. J. Enol. Viticult.* 16 (1965) 144-158.
- [36] S. Chevion, E.M. Berry, N. Kitrossky, R. Kohen, Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry, *Free Radic. Biol. Medic.* 22 (1997) 411-421.
- [37] S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion, The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity, *Free Radic. Biol. Medic.* 28 (2000) 860-870.
- [38] R.L. Prior, X.L. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4290-4302.
- [39] A. Medina-Remon, A. Barrionuevo-Gonzalez, R. Zamora-Ros, C. Andres-Lacueva, R. Estruch, M.A. Martinez-Gonzalez, J. Diez-Espino, R.M. Lamuela-Raventós, Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 54-60.

- [40] L.M. Magalhães, F. Santos, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity, *Talanta*, in press.
- [41] F.Z. Erdemgil, S. Sanli, N. Sanli, G. Özkan, J. Barbosa, J. Guiteras, J.L. Beltrán, Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology nad potentiometry, *Talanta* 72 (2007) 489-496.